Vergleichende Untersuchungen zur Synthese variierter Insulin-A-Ketten

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
PETER KÖHLER
aus Hirschberg

1969

Vergleichende Untersuchungen zur Synthese variierter Insulin-A-Ketten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

PETER KÖHLER

aus Hirschberg

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter: Professor Dr.Dr. G. Weitzel

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Schneider

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Günther Weitzel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und für die mir während dessen Bearbeitung erwiesene großzügige Förderung.

Herrn Dr. S. Hörnle und Herrn Dr. U. Weber bin ich für vielfache Unterstützung und wertvolle Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Der mikroanalytischen Abteilung des Instituts unter Leitung von Frau Dr. A.-M. Fretzdorff danke ich für die analytischen Arbeiten.

Für die Messung der Insulinaktivitäten im Fettkörpertest danke ich Herrn Dr. W. Kemmler und Herrn Dr. K. Rager.

Die natürliche B-Kette wurde freundlicherweise von Herrn Diplom-Biochemiker H. Großmann zur Verfügung gestellt.

Abkürzungen

Symbole der Aminosäuren, Peptide und ihrer Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln.

J. biol. Chem. 241, 2491 (1966)
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967)

Außerdem wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AS	=	Aminosäure
$ASSO_3^-$	=	S-Sulfonatform der A-Kette
$BSSO_3^-$	=	S-Sulfonatform der B-Kette
DCCI	=	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	=	Dicyclohexylamin
DMF	=	Dimethylformamid
Dpm	=	Diphenylmethyl-Rest
DTNB	=	5,5'-Dithiobis-(2-nitro-benzosäure)
Et_3N	=	Triäthylamin
EtOH	=	Äthanol
HOAc	=	Essigsäure
TFA	=	Trifluoressigsäure
THF	=	Tetrahydrofuran
TRIS	=	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung 1

2. Eigene Untersuchungen und Diskussion der Ergebnisse 8

2.1 Synthese der $\angle$Ala^{12}, Phe^{14}, Phe$^{19}_$7-A-Kette des Schafinsulins (Fragmentkondensation) 8

2.1.1 Wahl der geeigneten Schutzgruppen 8

2.1.2 Synthese des S-benzylierten Nonapeptids 11

2.1.3 Synthese des S-benzylierten Dodecapeptids 11

2.1.4 Darstellung des geschützten Heneikosipeptids 15

2.1.5 Stufenweise Abspaltung der Schutzgruppen 17

2.1.6 Überführung der A-Kette in die Tetra-S-sulfonatform, ihre Reinigung und Kombination mit natürlicher Bis-S-sulfonat-B-Kette des Rinderinsulins 17

2.1.7 Aktivitätsbestimmung des Hybridinsulins 18

2.2 Peptidsynthese am Festkörper nach MERRIFIELD unter Verwendung des Diphenylmethyl-Restes als Thiolgruppenschutz 19

2.2.1 Synthese des S-diphenylmethylierten Pentapeptids der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Ala 24

2.2.2 Synthese der $\angle$Ala$^{12}_$7-A-Kette des Schafinsulins 31

2.2.3 Synthese der $\angle$Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}, Ala$^{21}_$7-A-Kette des Schafinsulins 35

3. Beschreibung der Versuche 38

3.1 Analytische Methoden 38

3.1.1 Allgemeine analytische Methoden 38

3.1.2 SH-Gruppenbestimmung nach CAVALLINI 41

3.1.3 Der Mäusefalltest 42

3.2 Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe 43

3.3 Allgemeine Synthesen 45

3.4 Synthese der $\angle$Ala^{12}, Phe^{14}, Phe$^{19}_$7-A-Kette des Schafinsulins (Fragmentkondensation) 47

3.5 Darstellung des MERRIFIELD-Harzes, dessen Chlormethylierung und Anesterung von Boc-Aminosäurederivaten 64

3.6 Darstellung der Boc-Aminosäurederivate 66
3.7 Synthese des S-diphenylmethylierten Pentapeptids Glu-Asn-Phe-Cys(Dpm)-Ala 77
3.8 Darstellung des Peptids Bis-(Glu-Asn-Phe)-Cys_2-bis-Ala 80
3.9 Synthese der $\underline{/}Ala^{12}\overline{7}$-A-Kette des Schafinsulins 81
3.10 Synthese der $\underline{/}Ala^{12}; Phe^{14}, Phe^{19}, Ala^{21}\overline{7}$-A-Kette des Schafinsulins 85
4. Zusammenfassung 87
5. Literaturverzeichnis 89

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Das Eiweißhormon Insulin ist in den vergangenen Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen vollsynthetisch dargestellt worden. Ende 1963 gelang ZAHN und Mitarbeitern[1] und etwa zur gleichen Zeit auch KATSOYANNIS et al.[2,3] die Darstellung des Schafinsulins. Die Synthese des Rinderinsulins erfolgte 1965 durch einen chinesischen Arbeitskreis[4]. Bei diesen Synthesen wurden die partiell geschützten A- und B-Ketten aus mehreren, nach der konventionellen Peptidsynthese dargestellten Fragmenten zusammengesetzt. Dieses Schema hatte sich gut bewährt, so daß in der Folgezeit auch Humaninsulin und verschiedene Hybridinsuline dargestellt und zum Teil kristallisiert werden konnten[5-8].

Von WEITZEL und Mitarbeitern[9,10] wurden diese Verfahren, die sich nur in methodischen Details voneinander unterscheiden, aufgegriffen, um durch Synthese von Hybridinsulinen mit variierter Aminosäuresequenz die Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Wirkung kennenzulernen. Diese Untersuchungen beschränkten sich zunächst auf die A-Kette, die mit natürlicher B-Kette des Rinderinsulins zum entsprechenden Hybrid kombiniert wurde. Als Bezugssystem diente die Sequenz der A-Kette des Schafinsulins[11].

Nachdem ein in den Positionen A 12 (Ser → Ala) und A 19 (Tyr → Phe) variiertes Hybridinsulin synthetisiert und dabei gezeigt worden war, daß L-Tyrosin in A 19 ohne Wirkungsverlust durch L-Phenylalanin ersetzt werden kann[9], sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der zweite Tyrosinrest in Stellung A 14 gegen L-Phenylalanin ausgetauscht und somit eine tyrosinfreie A-Kette synthetisiert werden.

Die Frage, ob die phenolischen Hydroxygruppen für die biologische Wirksamkeit des Insulins notwendig sind, hatte in den vergangenen Jahrzehnten immer wieder lebhaftes Interesse gefunden. Verschiedene Arbeitsgruppen[12-21] hatten durch Substitutionsreaktionen am Insulin Ergebnisse erzielt, die

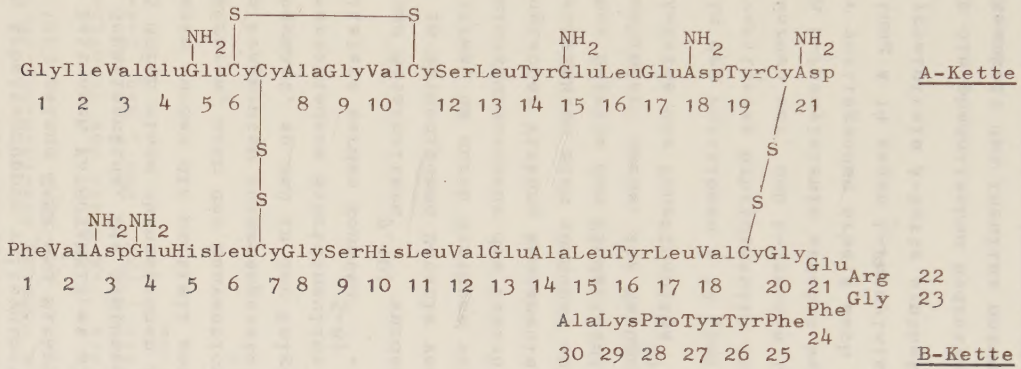


Abb. 1 Formel des Schafinsulins

auf eine Unerläßlichkeit der Aromaten und ihrer Hydroxygruppen für die volle biologische Wirksamkeit hindeuten. So hebt z.B. eine weitgehende Jodierung[22,23] die Insulinwirkung auf. Da es auf diese Weise jedoch nicht möglich ist, einen bestimmten Tyrosinrest gezielt zu blockieren, konnte die Frage, welche Tyrosinreste für die Aktivitätserhaltung notwendig sind, bisher nicht geklärt werden. Als Methode der Wahl bot sich dafür die Synthese entsprechend variierter Insuline an.

Die erste Aufgabe dieser Arbeit sollte es deshalb sein, nach konventioneller Methodik eine A-Kette zu synthetisieren, deren Tyrosinreste (A 14 und A 19) gegen Phenylalanin ausgetauscht sind.

Die bisherigen Resultate haben gezeigt, daß die chemische Synthese des Insulins in vielen Punkten noch außerordentlich unbefriedigend verläuft. Die Schwierigkeiten liegen dabei einerseits in der Verknüpfung der beiden Ketten, d.h. in der Disulfid-Kombination, die unter Erhalt einer unübersehbaren Zahl von Produkten nur in geringer Ausbeute verläuft. Durch geeignete Reaktionsbedingungen konnte allerdings die Kombination auf eine die Bildungswahrscheinlichkeit übersteigende Ausbeute von 2o-4o% erhöht werden. Das zweite Haupthindernis liegt im Thiolgruppenschutz während der Ketten-Synthese. Bei allen Insulinsynthesen wurde der von DU VIGNEAUD[24-27] in die Peptidsynthese eingeführte S-Benzylrest als SH-Gruppenschutz verwendet. Dieser übersteht zwar eine vielstufige Synthese, er kann jedoch nur durch eine Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt werden. Bei dieser Prozedur treten zahlreiche Nebenreaktionen auf, die zu einer weitgehenden Zerstörung der Polypeptidketten führen[28,29]. Das dritte Problem der konventionellen Synthesen der Insulinketten liegt in den geringen Ausbeuten. Sie betragen für die geschützte A-Kette, bezogen auf die C-terminale Aminosäure, nicht mehr als 3%.

Hier konnte nun die von MERRIFIELD[30-36] entwickelte Peptidsynthese an festen Trägern einen Ausweg bieten. Mit dieser neuen, leistungsfähigen Methode wurden in wenigen Wochen die A-Ketten[37,38] und B-Ketten[39] des Insulins und eine Reihe weiterer biologisch aktiver Peptide aufgebaut[40-46]. Die Ausbeuten an gereinigter Tetra-S-sulfonat-A-Kette betrugen bis zu 40%, bezogen auf die eingesetzte erste Aminosäure. Da aber auch hier mit S-benzyliertem Cystein gearbeitet wurde, also eine Entfernung der Schutzgruppen durch Natrium in flüssigem Ammoniak nötig war, lagen die biologischen Aktivitäten der nach Kettenkombination erhaltenen Insuline in der Größenordnung von 1-2%, d.h. nicht höher als bei Anwendung der konventionellen Synthese.

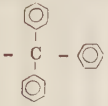
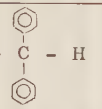
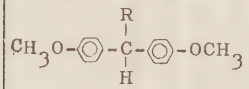
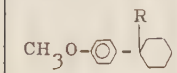
Die zweite Aufgabe dieser Arbeit war es deshalb, unter Anwendung der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD einen Thiolgruppenschutz zu erproben, der zunächst eine vielstufige Synthese übersteht, danach aber unter milderen Bedingungen abgespalten werden kann, als dies beim S-Benzylrest der Fall ist.
Auf diese Weise sollte auch eine höhere Aktivität des synthetisierten Hybridinsulins erzielt werden können. Da als α-Aminogruppenschutz der auch von MERRIFIELD verwendete tert.-Butyloxycarbonyl-Rest dienen sollte, standen die Stabilitätsbedingungen für einen neuen Thiolgruppenschutz von Anfang an fest. Die Schwefelschutzgruppe mußte resistent sein gegenüber 1 n Chlorwasserstoff in Essigsäure, denn damit wird vor jeder neuen Peptidsynthese der Aminogruppenschutz entfernt. Andererseits sollte aber auch eine acidolytische Spaltbarkeit der SH-Schutzgruppe angestrebt werden, da die Acidolyse günstiger ist als eine Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Zudem sind nach den bisherigen Erfahrungen die A-Kettenprodukte des Insulins auch gegenüber stärkeren Säuren (z.B. mit Bromwasserstoff gesättigte Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur) relativ stabil.

In der Literatur sind viele Schwefelschutzgruppen zu finden, die den erwähnten Stabilitäts- und Spaltungs-Bedingungen entsprechen könnten[47-51]. In Tabelle 1 ist das Verhalten einiger SH-Schutzgruppen gegenüber Säuren zusammengefaßt. Die angegebenen Daten sind teilweise der Literatur entnommen. Einige wurden während dieser Arbeit in Vorversuchen ermittelt. Die Bestimmung der freien SH-Gruppen erfolgte dabei qualitativ mit Hilfe chromatographischer Verfahren und der Nitroprussidnatrium-Reaktion, die quantitative Auswertung gelang mittels der von ELLMAN[52] entwickelten Methode mit DTNB als SH-Gruppen anzeigendes Reagenz.

Die Deblockierungsbedingungen für den S-Trityl-, S-Diphenylmethyl- und den S-Benzyloxycarbonyl-Rest sind eingehend von ZERVAS und Mitarbeitern[53,54] untersucht worden. HANSON und LAW[55] verwendeten bei einer Oxytocin-Synthese den S-4,4'-Dimethoxy-diphenylmethyl-Rest, und eine Arbeitsgruppe der Farbwerke HOECHST AG[51] untersuchte das Verhalten einiger tert.-Aralkyl-Reste, die im Hinblick auf ihre Konstitution zwischen dem gegenüber Säuren leicht abspaltbaren S-Trityl-Rest und dem äußerst stabilen S-tert.-Butyl-Rest einzuordnen sind. Darunter befand sich auch der schon erwähnte Diphenylmethyl-Rest und sein entsprechendes 4,4'-Dimethoxyderivat. Außerdem schien von diesen Schutzgruppen der S-p-Methoxyphenyl-cyclohexyl-Rest ein günstiges Verhalten zu versprechen. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, war jedoch praktisch nur zwischen dem Diphenylmethyl- und dem 4,4'-Dimethoxy-diphenylmethyl-Rest zu wählen, da alle anderen Schutzgruppen die Stabilitätsbedingungen nicht erfüllen.

Die Wahl fiel schließlich auf den S-Dipheylmethyl-Rest, der gegenüber seinem Dimethoxyderivat den Vorteil der größeren Stabilität bei einer vielstufigen Peptidsynthese versprach. Für seine Abspaltung sollte siedende Trifluoressigsäure in Gegenwart von Phenol dienen.

Voraussetzung für die Synthese einer S-diphenylmethylierten A-Kette war die gleichzeitige Abwesenheit anderer Schutz-

R-S-CH_2-CH(NH$_2$)-COOH	TFA 72°	TFA 72° mit Phenol-zusatz	TFA HBr gesättigt	1nHBr/HOAc	2nHBr/HOAc	1nHCl/HOAc
	30 Min. 95 % 54)		+ e)	5 Min./10° 98 % 54)	+ 54)	10 Min./20° 80 % e)
	Spuren e)	20 Min. + e)	90 Min. 30 % e)	Spuren	60 Min./20° 10 % 90 Min./50° 50 % 54)	- e)
	120 Min. 95 % 51)	10 Min. + 51)				- 50)
	5 Min. + 51)					30 Min./20° teilweise Spaltung e)
R-CO-O-CH_2-	+ 53)				20 Min./20° + 54)	nicht stabil e)

Tab. 1 Spaltbarkeit verschiedener Thiolschutzgruppen durch Säuren in Abhängigkeit von der Temperatur und Spaltungsdauer.
+ = vollständige Spaltung, - = keine Spaltung, e = eigene Versuche
Angaben ohne Temperaturbedingungen beziehen sich auf Raumtemperatur.

gruppen, die gegenüber siedender Trifluoressigsäure resistent sind. Dies gilt für den O-Benzylrest des Serins. Hier erwies sich jedoch bei der Syntheseplanung unser Befund[9], daß Serin (A 12) der Schafinsulin-A-Kette durch Alanin ohne Wirkungsverlust austauschbar ist, als äußerst nützlich.

Außerdem sollte eine in noch anderen Positionen variierte A-Kette nach demselben Verfahren synthetisiert werden. Die volle biologische Wirksamkeit dieser Sequenz war bei Beginn dieser Synthese durch eine Darstellung über die S-benzylierte Form bereits bestätigt worden[56].

Vor Beginn der A-Ketten-Synthesen sollte der S-Dipheylmethyl-Rest im Zusammenhang mit der Festkörpersynthese an einem Modellpeptid erprobt werden. Außerdem sollte der Einfluß von siedender Trifluoressigsäure auf dieses Peptid, auf Rinderinsulin-A-Kette und auf Rinderinsulin geprüft werden.

Im folgenden wird der Verlauf der Voruntersuchungen und der Synthesen beschrieben; die Ergebnisse werden diskutiert.

2. Eigene Untersuchungen und Diskussion der Ergebnisse

2.1 Synthese der [Āla[12], Phe[14], Phe[19]]-A-Kette des Schafinsulins (Fragmentkondensation)

Die Synthese dieser gegenüber der Schafinsulin-A-Kette in drei Positionen variierten A-Kette wurde im Prinzip nach den Syntheseplänen von ZAHN und Mitarbeitern[57] sowie KATSOYANNIS und Mitarbeitern[58-60] durch Fragmentkondensation von fünf kleineren Peptiden durchgeführt. Die letzte Kupplungsstelle war auch hier die Bindungsstelle Gly-Val (Position A 9-10) über die Methode der gemischten Anhydride. Diese Methode erwies sich vor allem deshalb als vorteilhaft, weil überraschend hohe Ausbeuten von über 90% erzielt wurden und für die Durchführung der Synthese ein geringer Zeitaufwand erforderlich war.

Auch die Kupplungen zwischen den kleineren Fragmenten, die ausschließlich über die Azidmethode erfolgten, verliefen durchweg befriedigend und in für diese Methode üblichen Ausbeuten zwischen 40 und 70%. Die Gefahr einer Razemisierung besteht hierbei nicht, und die Bildung von Nebenreaktionen konnte durch Arbeiten in der Kälte weitgehend zurückgedrängt werden. Von Nachteil erwiesen sich allerdings die langen Reaktionszeiten von durchschnittlich drei bis fünf Tagen.

2.1.1 Wahl der geeigneten Schutzgruppen

Bei der Wahl der geeigneten Schutzgruppen wurde auf solche zurückgegriffen, die bei allen bekannten Synthesen der Insulin-Ketten verwendet werden. Es kam im Rahmen dieser Arbeit darauf an, eine möglichst günstige Kombination der zur Verfügung stehenden Schutzgruppen auszuwählen.

Als Aminoschutzgruppe diente ausschließlich der Benzyloxycarbonylrest[61], der bei schwefelfreien Peptiden auf elegante Weise durch katalytische Hydrogenierung und bei cysteinhaltigen Peptiden durch Verwendung von Bromwasserstoff in Eisessig[62] gespalten werden kann.

Als Thiolgruppenschutz wurde die S-Benzylgruppe[24] verwendet. Der Vorteil dieser Schutzgruppe liegt darin, daß sie eine vielstufige Synthese übersteht; jedoch steht dieser Stabilität als Nachteil gegenüber, daß eine Entfernung nur durch Natrium in flüssigem Ammoniak erfolgen kann. Bei dieser Prozedur können Nebenreaktionen, wie Kettenabbau, Cysteinentschwefelung oder Reduktionen an verschiedenen Aminosäureresten eintreten[28,29].

Die in dieser Arbeit beschriebene variierte A-Kette des Schafinsulins enthält eine Asparagin-α-carboxylgruppe und zwei Glutaminsäure-γ-carboxylgruppen. Da darüber hinaus aber auch der Carboxylschutz von Fragmenten von Bedeutung ist, muß bei der Synthese der Insulin-A-Kette mit mindestens zwei verschiedenen Typen von Carboxylschutzgruppen gearbeitet werden. Für die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure bei A 4 wurde die von den Arbeitsgruppen ZAHN und KATSOYANNIS bevorzugte tert.-Butylierung[63] durchgeführt. Auch wurde diese Gruppe in A 17 während einer Kondensation mit dem tert.-Butylrest blockiert. Diese Schutzgruppe kann bereits durch milde Acidolyse entfernt werden. KATSOYANNIS et al.[64] schützten Glu A 17 mit dem Benzylrest, legten also Wert auf einen permanenten Schutz dieser Carboxylgruppe. Dieses wirkt sich zwar günstig auf die Löslichkeit und für die Reinigung der Zwischenprodukte aus, führt aber nach acidolytischer Spaltung des Benzyloxycarbonylrestes von A 17 zu uneinheitlichen Reaktionsprodukten, da der Glutaminsäure-γ-benzylester unter diesen Bedingungen nur einer teilweisen Spaltung unterliegt.

Für überflüssig wurde es gehalten, die α-Carboxylgruppe des C-terminalen Asparagins zu schützen. Dies erweist sich einmal aus synthetischen Gründen als vorteilhaft. Dadurch, daß direkt freies Asparagin mit Z-Cys(Bzl) nach der Methode der gemischten Anhydride[65] umgesetzt werden kann, erzielt man einen erheblichen Zeitgewinn. Außerdem kann die Veresterung eines C-terminalen Asparaginrestes gefährlich sein, weil sie leicht zur Ringbildung unter Bildung von Succinimid-

Derivaten[66-69] führen kann, die dann weiter Sekundärreaktionen unterliegen können. Nachteilig waren bei dieser Syntheseplanung die geringen Ausbeuten der Peptidderivate, die mit ungeschütztem Asparagin erhalten wurden, sowie deren Schwerlöslichkeit in hydrophoben Lösungsmitteln. Damit ergaben sich auch Schwierigkeiten bei der Reinigung der Peptide.

Als vorübergehender Schutz für die α-Carboxylgruppen in den kleineren Fragmenten und als Vorstufe für die Hydrazidbildung wurden die Methylestergruppe und bei Gly in A 9 der Äthylrest verwendet. Dieser wurde jedoch nach der Synthese der Sequenzstufe A 6-9 durch alkalische Verseifung entfernt, und zwar deshalb, weil die freie Carboxylgruppe in Gly A 9 für die spätere Veresterung mit Chlorameisensäureäthylester zur Verfügung stehen muß. Die Verseifung kann nicht erst auf der Stufe des fertigen Fragmentes A 5-9 erfolgen, da in Position A 5 Glutamin mit einer gegen Alkali empfindlichen Säureamidbindung steht.

KATSOYANNIS[60] hat zu dieser Synthese die Alternative eines stetigen Schutzes der Glycincarboxylgruppe in A 9 aufgezeigt. Die Verknüpfung von Nona- und Dodeca-Peptid mußte dann allerdings über eine Hydrazidierung des Esters mit Hilfe der Azidmethode erfolgen. Diese erbrachte gegenüber der gemischten Anhydridmethode zwar schlechtere Ausbeuten, dafür mußten bei der in dieser Arbeit verfolgten Synthesestrategie Ausbeuteverluste bei der Verseifung des A 6-9-Äthylesters in Kauf genommen werden.

Das Problem des Hydroxylgruppenschutzes war in dieser Arbeit nicht vorhanden, da die Aminosäuren Serin in Position A 12 und Tyrosin in den Positionen A 14 und A 19 durch Alanin bzw. Phenylalanin ersetzt wurden.

2.1.2 Synthese des S-benzylierten Nonapeptids A 1-9

Das Nonapeptidderivat A 1-9 wurde durch Fragmentkondensation nach der Azidmethode aus den Teilsequenzen A 1-4 und A 5-9 nach ZAHN und Mitarbeitern[70] aufgebaut.

Das Tetrapeptidderivat der Sequenz Gly-Ile-Val-Glu (A 1-4) wurde durch schrittweisen Aufbau nach der p-Nitrophenylestermethode[71,72] als Methylester erhalten und nach dessen Hydrazidierung in das Azid übergeführt. Ebenfalls durch schrittweisen Aufbau über die p-Nitrophenylester wurde das Pentapeptid der Sequenz Gln-Cys-Cys-Ala-Gly (A 5-9) dargestellt. Beide Peptide entsprachen in ihren Eigenschaften den von ZAHN und Mitarbeitern[70] erhaltenen Produkten.

Das Nonapeptid wurde in 45%iger Ausbeute erhalten. Es erwies sich papierchromatographisch einheitlich und zeigte eine zufriedenstellende Aminosäureanalyse.

2.1.3 Synthese des S-benzylierten Dodecapeptids A 10-21

Die Synthese dieses geschützten Peptids wurde gemäß dem Schema (Abb. 2) durchgeführt.

Das Tripeptid der Sequenz Val-Cys-Ala (A 10-12) wurde als Z-Val-Cys(Bzl)-Ala-OMe nach der p-Nitrophenylestermethode[71,72] dargestellt und in das Hydrazid übergeführt.

Die Synthese des kristallisiert erhaltenen Dipeptids Z-Cys(Bzl)-Ala-OMe in Dimethylformamid verlief glatt und mit einer Ausbeute von 80%.

Auch die Darstellung des geschützten Tripeptids Z-Val-Cys (Bzl)-Ala-OMe verlief gut. Bei der Reinigung erwies sich die Rekristallisation aus Essigester in Gegenwart von wenig Äthanol als sehr wirksam. Die Ausbeute betrug 60%. Die anschließende Überführung in das entsprechende Hydrazid verlief in Dimethylformamid in 96%iger Ausbeute.

Die Gesamtausbeute über alle Stufen betrug 46%.

Das Tetrapeptid der Sequenz Leu-Phe-Gln-Leu (A 13-16) wurde ebenfalls stufenweise nach der p-Nitrophenylestermethode

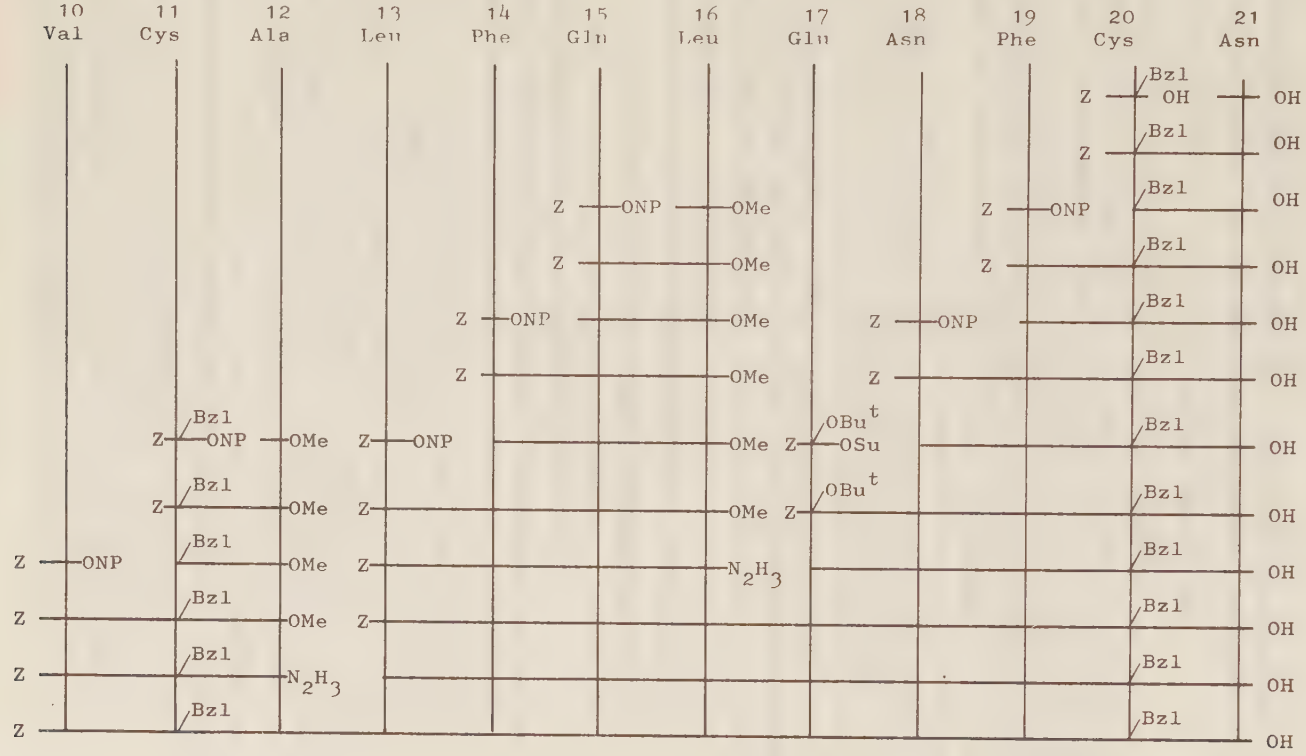


Abb. 2 Synthese-Schema des S-benzylierten Dodecapeptids

als Z-Leu-Phe-Gln-Leu-OMe aufgebaut und in das Hydrazid übergeführt. Das Dipeptid wurde dabei kristallisiert in 80%iger Ausbeute erhalten. Ebenso wurde nach anschließender Kupplung des decarbobenzoxylierten Produktes mit Z-Phe-ONP in 80%iger Ausbeute das Tripeptid Z-Phe-Gln-Leu-OMe erhalten. Dieses Peptid zeigte gegenüber der Sequenz Z-Tyr(Bzl)-Gln-Leu-OMe[58] eine schlechtere Löslichkeit. Es konnte aus Methanol/Wasser kristallisiert werden.

Auch das Tetrapeptidderivat der Sequenz Leu-Phe-Gln-Leu wurde kristallisiert als Z-Leu-Phe-Gln-Leu-OMe in 80%iger Ausbeute in großer Reinheit erhalten. Wiederum waren die Löslichkeitseigenschaften erheblich schlechter als die des entsprechenden tyrosinhaltigen Peptids[58], weshalb die Überführung in das Hydrazid nicht in Methanol sondern in Dimethylformamid erfolgen mußte.

Die Gesamtausbeute über alle Stufen betrug 47%. Alle Zwischenprodukte und das Endprodukt waren in Form ihrer Hydrobromide chromatographisch einheitlich.

Das Pentapeptid der Sequenz A 17-21 wurde stufenweise als Z-Glu(OBu^t)-Asn-Phe-Cys(Bzl)-Asn synthetisiert[73]. Als einziges Zwischenprodukt konnte das nach der gemischten Anhydridmethode aufgebaute Dipeptid Z-Cys(Bzl)-Asn kristallisiert erhalten werden. Die Ausbeute betrug 50%. Die Sequenzverlängerung erfolgte danach nach der p-Nitrophenylestermethode. Die erhaltenen Peptidderivate Z-Phe-Cys(Bzl)-Asn und Z-Asn-Phe-Cys(Bzl)-Asn konnten durch Umfällen aus Dimethylformamid/Wasser und durch Auskochen mit Äthanol und Essigester gereinigt werden. Die Ausbeuten betrugen jeweils 70 %. Das freie Amin des Tetrapeptidderivates wurde schließlich mit Z-Glu(OBu^t)-OSu[74] gekuppelt, was zum Pentapeptid Z-Glu(OBu^t)-Asn-Phe-Cys(Bzl)-Asn in 66%iger Ausbeute führte.

Die Gesamtausbeute über alle Stufen betrug 17%. Auch hier erwiesen sich alle Zwischenprodukte und das Endprodukt als chromatographisch einheitlich.

Der Aufbau des Dodecapeptids A 10-21 sollte ursprünglich nach in der von ZAHN[75] angegebenen Weise erfolgen, indem zunächst durch Azidsynthese das Heptapeptid der Sequenz A 10-16 und schließlich über eine zweite Azidsynthese dieses Derivates mit dem freien Amin des Pentapeptids A 17-21 die Sequenz A 10-21 gebildet werden sollte. Dabei verlief die Azidkupplung der Sequenz A 10-12 mit der Sequenz A 13-16 zum geschützten Heptapeptid Z-Val-Cys(Bzl)-Ala-Leu-Phe-Gln-Leu-OMe glatt und in guter Ausbeute. Von besonderem Vorteil erwies sich dabei, daß die Synthese in Essigester durchgeführt werden konnte. Aus diesem Lösungsmittel fiel das gebildete Heptapeptidderivat in der Kälte in großer Reinheit aus, während die Ausgangs- und Nebenprodukte in Lösung blieben. Die Ausbeute betrug 60%.

Wegen der schlechten Löslichkeitseigenschaften des Heptapeptidderivates bereitete die Überführung in das Hydrazid Schwierigkeiten. Um ein Ausfallen des Peptidesters während der Umsetzung in Dimethylformamid bei Zugabe von Hydrazinhydrat zu verhindern, mußte dieses vor der Zugabe in die heiße Lösung auf 40-50° erwärmt werden. Auf diese Weise verlief zwar die Hydrazidbildung noch einigermaßen glatt, jedoch waren die Löslichkeitseigenschaften dieses A 10-16-Hydrazids so schlecht, daß die anschließende Synthese mit der Sequenz A 17-21 zum geschützten Dodecapeptid nicht durchgeführt werden konnte.

Es wurde deshalb zunächst die Azidsynthese mit den Komponenten A 13-16 und A 17-21 zum geschützten Nonapeptid Z-Leu-Phe-Gln-Leu-Glu-Asn-Phe-Cys(Bzl)-Asn durchgeführt. Dieser Syntheseschritt verlief glatt und in einer für eine Azidsynthese guten Ausbeute von 40%.

Die anschließende Azidkupplung der Komponenten A 10-12 mit A 13-21 zum geschützten Dodecapeptid A 10-21 verlief ebenfalls ohne Schwierigkeiten. Die Ausbeute betrug hier sogar 58%. Das Peptidderivat ließ sich durch Auskochen mit Methanol von Verunreinigungen befreien.

2.1.4 Darstellung des geschützten Heneikosipeptids

Die Kupplung der Kettenfragmente A 1-9 und A 10-21 zum geschützten Heneikosipeptid erfolgte mit äquivalenten Mengen Nona- und Dodecapeptidderivat in Hexamethylphosphorsäuretriamid/Dimethylformamid über das gemischte Anhydrid der Nonapeptidsäure mit Kohlensäureäthylester. Das vollgeschützte A-Kettenprodukt wurde mehrfach mit Methanol ausgekocht. Die Ausbeute betrug 92%.

Die ausgezeichnete Aminosäureanalyse deutete auf eine gute Reinheit des A-Kettenproduktes hin, wobei die erhöhten Werte von Cys und Cys(Bzl) auf Schwierigkeiten bei der Auswertung zurückzuführen sind, da beide Komponenten im Analysator flache Peaks mit dichter Punktfolge ergeben.

Molares Verhältnis der Aminosäuren in synthetischer [Āla^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}]-A-Kette des Schafinsulins in der S-benzylierten Form

Aminosäure	Theoretische Molzahl	Gefundene Molzahl
Asp	2,oo	1,94
Glu	4,oo	3,85
Gly	2,oo	2,1o
Ala	2,oo	2,o9
Val	2,oo	1,9o
Ile	1,oo	1,o1
Leu	2,oo	2,o1
Phe	2,oo	2,o4
Cys + Cys(Bzl)	4,oo	4,61

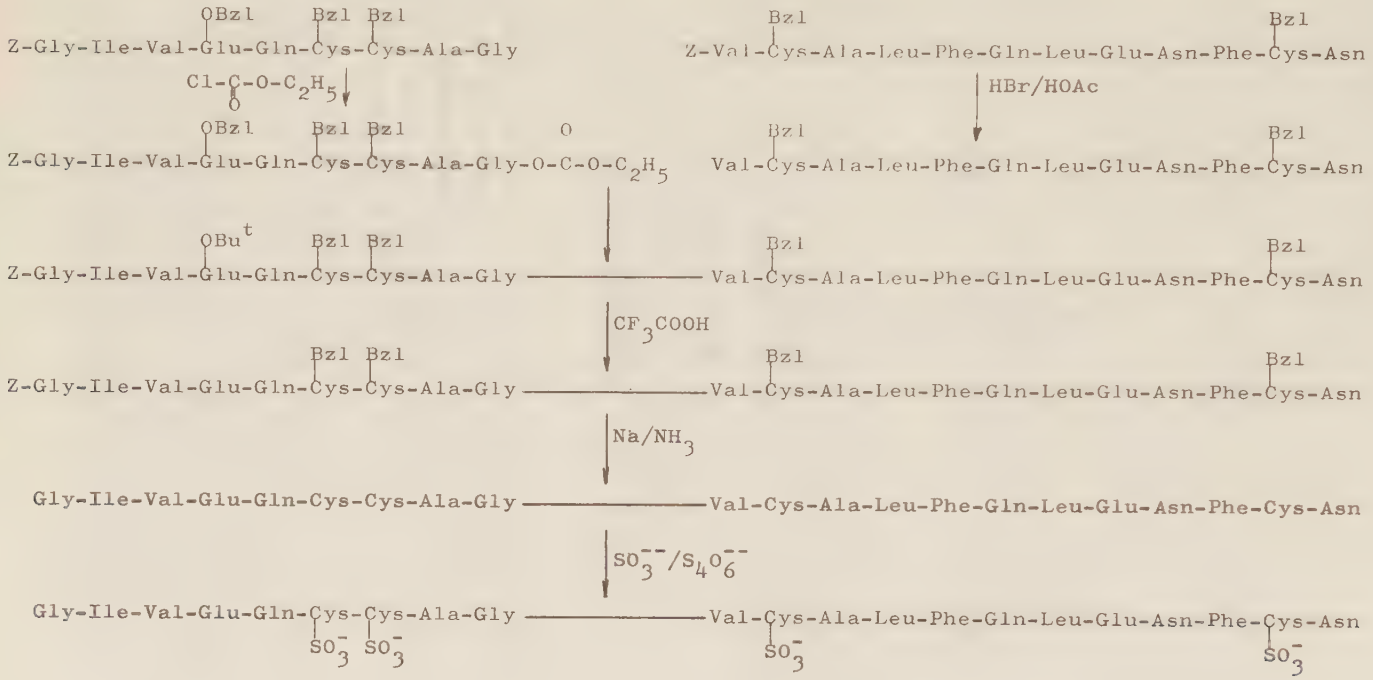


Abb. 3 Synthese-Schema der Tetra-S-sulfonat-/Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}/-A-Kette des Schafinsulins über ihre S-benzylierte Form.

2.1.5 Stufenweise Abspaltung der Schutzgruppen

Das geschützte Heneikosipeptid wurde zunächst mit Trifluoressigsäure behandelt, um die natriumresistente Schutzgruppe bei A 4 (tert.-Butylester) zu entfernen. Die nachfolgende Einwirkung von Natrium in flüssigem Ammoniak führte zur Abspaltung des Z-Restes und der vier S-Benzylgruppen. Um einen weitgehenden Kettenabbau zu vermeiden, wurde die bleibende Blaufärbung nur für eine Minute aufrechterhalten. Die gesamte Reduktionsbehandlung dauerte ca. 5 Minuten.

2.1.6 Überführung der A-Kette in die Tetra-S-sulfonatform, ihre Reinigung und Kombination mit natürlicher Bis-S-sulfonat-B-Kette des Rinderinsulins

Die Überführung der A-Kette in die Tetra-S-sulfonatform erfolgte in der üblichen Weise mit Natriumsulfit und Natriumtetrathionat bei 37° in Tris-Puffer bei pH 9,2. Nach 3 Stdn. waren keine freien SH-Gruppen mehr nachweisbar.

Die erhaltene Buntesalz-Kette wurde über Sephadex G-25 fine in 0,02 M Ammoniumhydrogencarbonat gereinigt.

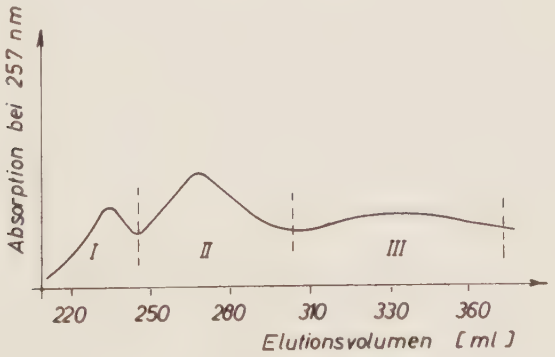


Abb. 4 Elutionsdiagramm der Tetra-S-sulfonat-A-Kette an einer Sephadex-G-25-Säule (3,8 x 72 cm). Eluant: 0,02 M NH_4HCO_3-Lösung. Durchfluß: 80 ml/h.

Die UV-Absorbtionskurve bei der Gelfiltration zeigte drei Fraktionen, die getrennt durch Gefriertrocknung isoliert wurden. Bei Peak I handelt es sich vermutlich um polymere A-Ketten-Produkte, während sich die Fraktion II als S-Sulfonat der A-Kette erwies. Der langgezogene Peak III enthält die A-Ketten-Fragmente A 1-9 und A 10-21 sowie kleinere Peptidbruchstücke.

Der gesondert lyophilisierte Peak II wurde nach dem von KATSOYANNIS[76] angegebenen Verfahren mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette kombiniert. Dazu wurde der vierfache Überschuß an S-Sulfonat-A-Kette, bezogen auf die eingesetzte B-Kette, mit dem 30-fachen Überschuß von Mercaptoäthanol reduziert.

2.1.7 Aktivitätsbestimmung des Hybridinsulins

Die Aktivität wurde nach der Kombination direkt in der erhaltenen Lösung bestimmt und auf die eingesetzte B-Kette bezogen. Die Messung der Insulinaktivität des Kombinates erfolgte im Mäusefalltest und im Fettkörpertest am Nebenhodenfettgewebe der Ratte.

Da die erhaltene Aktivität des Hybridinsulins (Mäusefalltest 1,2%, Fettkörpertest 1,0%) in demselben Größenordnungsbereich lag wie die des Hybridinsulins aus synthetischer A-Kette mit der Sequenz des Schafinsulins[11] und natürlicher B-Kette des Rinderinsulins (Mäusefalltest 1,0-1,5%, Fettkörpertest 1,0-2,0%), konnte damit die volle Wirksamkeit dieses Insulins mit einer tyrosinfreien A-Kette bewiesen werden.

2.2 Peptidsynthese am Festkörper nach MERRIFIELD unter Verwendung des Diphenylmethyl-Restes als Thiolgruppenschutz

Oben wurde bereits ausgeführt, weshalb in der vorliegenden Arbeit die zweite Synthese einer variierten A-Kette des Schafinsulins nach Strategie und Taktik sich grundlegend von der ersten Synthese unterscheiden sollte.

Die Strategie war hier nicht die klassische Peptidsynthese mit einer Verteilung in Fragmente, sondern die kontinuierliche Kettenverlängerung mit Hilfe der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD[30]. Im Prinzip werden dabei die höhermolekularen Peptide schrittweise an einem polymeren Träger aufgebaut und nach beendeter Synthese davon abgelöst. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die vollständige Umsetzung auf jeder Reaktionsstufe; dies kann durch Anwendung großer Reagenzüberschüsse erzwungen werden. Da das Reaktionsprodukt unlöslich ist, können alle niedermolekularen Reaktionspartner durch Auswaschen ohne Verlust an Syntheseprodukt entfernt werden.

Als Träger diente ein Copolymerisat aus Styrol/2% Divinylbenzol mit einer Korngröße von 125-200 µ, das durch Behandeln mit Zinn(IV)-chlorid in Methoxychlormethan chlormethyliert[77] wurde. Der Substitutionsgrad betrug 2,1 mMol Cl/g Harz. Außerdem wurde käufliches chlormethyliertes Harz mit einem Substitutionsgrad von 0,6 mMol Cl/g Harz verwendet.

Die erste Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids wurde durch eine Veresterungsreaktion ihrer α-Carboxylgruppe mit dem chlormethylierten Harz kovalent an den polymeren Träger gebunden. Die Aminogruppe und alle anderen reaktionsfähigen Funktionen wurden dabei durch Schutzgruppen blockiert, um Nebenreaktionen auszuschließen. Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe wurde die nächste Aminosäure als N-geschütztes Derivat ankondensiert. Als Kondensationsmittel diente das von SHEEHAN und HESS[78] in die Peptidsynthese eingeführte N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Reaktionsmedium war dabei stets Dichlormethan. Dieses Lösungsmittel hat sich besonders

deshalb bewährt, weil dadurch die Bildung von N-Acylharnstoffderivaten[79] aus den aktivierten Aminosäurederivaten und auch die Gefahr der Razemisierung[80] auf ein Minimum zurückgedrängt werden. Wie bei MERRIFIELD[30] wurde für die Ankondensation von Asparagin und Glutamin deren p-Nitrophenylester[81] benutzt. Diese Methode verhindert die Bildung von Dehydroderivaten, also Nitrilen, aus den Säureamiden, die in Gegenwart von Carbodiimiden beobachtet wurde[81,82].

Nach der Bildung des N-geschützten Dipeptids am Träger konnte so das zu synthetisierende Peptid in einem sich stetig wiederholenden Synthesezyklus stufenweise vom N-terminalen Ende her aufgebaut werden.

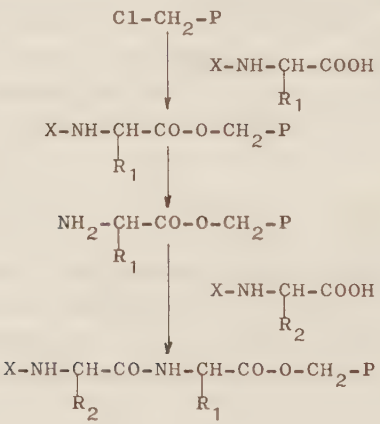


Abb. 5

Schematische Darstellung der Peptidsynthese nach MERRIFIELD

P = vernetztes Polystyrol

X = Aminoschutzgruppe

Bei der Wahl der Schutzgruppen wurde so vorgegangen, daß nach Möglichkeit ein weitgehend permanenter Schutz aller nicht an der Peptidsynthese beteiligten funktionellen Gruppen gewährleistet war. Da die α-Aminogruppe durchweg mit dem leicht acidolytisch spaltbaren tert.-Butyloxycarbonyl-Rest[83] geschützt wurde, standen damit für alle anderen Schutzgruppen die Stabilitätsbedingungen fest. Da zur Spaltung des Boc-Restes 1-n Chlorwasserstoff in Eisessig diente, sollten Hydroxyl-, γ-Carboxyl- und Sulfhydryl-Schutzgruppen dagegen resistent sein. Wie bei MERRIFIELD[30] wurden das Tyrosin als O-Benzyläther und die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure als Benzylester in die Peptidsynthese eingesetzt. Es konnte allerdings in Vorversuchen gezeigt werden, daß die Ätherbindung des O-Benzyltyrosins gegenüber 1 n HCl in Eisessig nicht stabil ist und daß ebenso der Glutaminsäure-γ-benzylester durch Einwirkung dieser Säure einer teilweisen Spaltung unterliegt. Die Aminosäurederivate befanden sich bei diesen Stabilitätsprüfungen immer in gelöstem Zustand. Die dabei erzielten Ergebnisse lassen sich daher nicht vorbehaltlos auf die Verhältnisse bei der Synthese am Festkörper übertragen, da hier die geschützten Peptide an den ungelösten polymeren Träger gebunden sind, so daß sie in einem molekularen Dispersionszustand und nicht in echter Lösung vorliegen.

Trotzdem wurde für den γ-Carboxylgruppenschutz der Glutaminsäure der γ-p-Nitrobenzylester, von dem eine größere Stabilität gegenüber acidolytisch spaltenden Reagenzien erwartet wurde, eingeführt. Dieses Aminosäurederivat wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals synthetisiert. Es wurde analog Glutaminsäure-γ-benzylester[84] als kristallines Produkt erhalten. Die Ausbeuten waren jedoch schlecht. Bei der Stabilitätsprüfung gegenüber 1 n HCl in Eisessig zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie sie beim γ-Benzylester bereits gefunden wurden. Auch der γ-p-Nitrobenzylester unterliegt einer teilweisen acidolytischen Spaltung in Chlorwasserstoff in Eisessig. Der Benzylester als γ-Carboxylgruppenschutz wurde deshalb beibehalten.

Bei in dieser Arbeit synthetisierten Peptiden wurde als Thiolgruppenschutz der Diphenylmethyl-Rest verwendet.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die S-Tritylgruppe als SH-Schutz den Bedingungen der Synthese, nämlich Resistenz gegenüber HCl in Eisessig, nicht standhält. Dies konnte qualitativ mit Hilfe der Nitroprussidnatrium-Reaktion auf freie SH-Gruppen und papierchromatographisch nachgewiesen werden. Die quantitative SH-Gruppenbestimmung nach CAVALLINI[85] zeigte, daß S-Trityl-cystein schon innerhalb kurzer Zeit zu 80% in die Ausgangskomponenten Cystein und Tritylchlorid gespalten wird. Ein ganz ähnliches Verhalten zeigten auch der S-p-Methoxyphenyl-cyclohexyl-Rest und die S-Carbobenzoxygruppe. Dabei zerfiel S-Carbobenzoxycystein in 1 n HCl in Eisessig sehr rasch vollständig in die Ausgangskomponenten (s. Tab. 1).

Anders verhielt sich dagegen S-Diphenylmethyl-cystein. Hier waren selbst nach 48-stündigem Stehen in 1 n HCl in Eisessig bei Raumtemperatur keine freien SH-Gruppen nachweisbar. Da die Spaltungsdauer des Boc-Restes vor Beginn einer neuen Peptidsynthese am Festkörper nur 30 Minuten dauert und sich diese Prozedur bei der Synthese der A-Kette zwanzigmal wiederholt, waren die Aussichten für eine erfolgreiche Verwendung dieser SH-Schutzgruppe von Anfang an gut.

Neben den genannten Stabilitätsbedingungen sollte die zu verwendende Thiolschutzgruppe nach beendeter Synthese unter für die Peptide schonenden Bedingungen wieder abspaltbar sein. Der Vorteil der in der Festkörpersynthese ausschließlich verwendeten S-Benzylschutzgruppe liegt zwar ebenfalls darin, daß sie eine vielstufige Synthese übersteht. Ihre Entfernung kann jedoch nur durch Behandlung von Natrium in flüssigem Ammoniak erfolgen, und diese Behandlung hat sich für die synthetisierten Peptide als ungünstig erwiesen, da dabei zahlreiche Nebenreaktionen eintreten können.

Da der S-Diphenylmethyl-Rest im Hinblick auf seine Konstitution zwischen dem S-Benzyl- und dem S-Trityl-Rest einzuordnen ist, sollte ein gegenüber dem S-Benzyl-Rest günsti-

geres Verhalten bei seiner Spaltung zu erwarten sein.

In Tabelle 1 sind einige Möglichkeiten zur Spaltung des Diphenylmethyl-Restes angeführt. Dabei hat sich die Trifluoressigsäure-Behandlung in Gegenwart eines Kationenfängers als die erfolgreichste erwiesen. Eine vollständige Spaltung von S-Diphenylmethyl-cystein durch siedende Trifluoressigsäure in Gegenwart von Phenol konnte bereits nach 20 Minuten Reaktionsdauer erreicht werden. Entscheidend ist dabei der Zusatz von Phenol (oder Anisol), das das intermediär auftretende Diphenylmethylkation unter Bildung eines Triphenylmethylderivates abfängt[51]. S-Diphenylmethyl-cystein ist in siedender Trifluoressigsäure ohne Phenol nach zwei Stunden noch unverändert. Eine acidolytische Spaltung mittels Bromwasserstoff in Eisessig verlief selbst bei höheren Temperaturen und langen Reaktionszeiten nicht quantitativ. Auch die Einwirkung von Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure führte nur zu einer teilweisen Spaltung.

Der Spaltungsgrad des Diphenylmethyl-Restes wurde durch die Bestimmung der bei der Spaltung frei werdenden SH-Gruppen nach der von CAVALLINI et al.[85] angegebenen Methode zur Bestimmung von Disulfidgruppen in Proteinen gemessen. Dieses Verfahren arbeitet mit DTNB als SH-Gruppen anzeigendes Reagenz. Es liefert mit den Thiolgruppen im schwach alkalischen Bereich ein gelb gefärbtes Anion, das bei 412 mμ ein Absorptionsmaximum hat und so eine photometrische Auswertung erlaubt.

Um die Verwendbarkeit des Diphenylmethyl-Restes als Thiolschutz bei der Festkörpersynthese zu prüfen, wurde zunächst ein Pentapeptid mit Beziehung zum C-terminalen Ende der A-Kette dargestellt und im Anschluß daran zwei variierte A-Ketten des Schafinsulins synthetisiert.

2.2.1 Synthese des S-diphenylmethylierten Pentapeptids der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Ala

Zum Aufbau des linearen Pentapeptids wurden die kristallinen Aminosäurederivate Boc-Ala, Boc-Cys(Dpm), Boc-Phe, Boc-Asn-ONP und Boc-Glu(OBzl) eingesetzt. Boc-Cys(Dpm) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals synthetisiert. Es wurde aus Cys(Dpm) durch Acylierung mit tert.-Butyloxycarbonylazid bei einem vorgegebenen pH von 9,8 im Autotitrator nach der Methode von SCHNABEL[86)] erhalten. Das ölig anfallende Rohprodukt konnte nach Reinigung über das DCHA-Salz in guter Ausbeute kristallisiert erhalten und charakterisiert werden.

Alle anderen in die Peptidsynthese eingesetzten Aminosäurederivate entsprachen in ihren Schmelzpunkten und optischen Aktivitäten den Literaturwerten.

Als Träger diente das käufliche chlormethylierte Copolymerisat aus Styrol/Divinylbenzol mit 2% Vernetzung. Der Chlorgehalt betrug 0,6 mMol Cl/g Harz. Die Anesterung des carboxylendständigen Alanis erfolgte nach dem von MERRIFIELD [30)] angegebenen Verfahren. Es wurde eine Aminosäurebeladung von 0,25 mMol Boc-Alanin/g Harz erhalten.

Die Synthese des Peptids wurde in einer Spezialapparatur durchgeführt. Die für einen Synthesezyklus benötigten Operationen sind im Schema der Tabelle 2 aufgeführt.

Zur Abspaltung der α-Aminoschutzgruppe diente 1 n Chlorwasserstoff in Essigsäure. Das dabei entstehende Hydrochlorid wurde mit Essigsäure, Äthanol und Dimethylformamid gewaschen und danach mit Triäthylamin in Dimethylformamid die Base freigesetzt. Nach Auswaschen des überschüssigen Triäthylamins mittels Dimethylformamid wurde die freie Base für 10 Minuten mit der Lösung des folgenden Boc-Aminosäure-Derivates geschüttelt, um eine möglichst gute Verteilung und ein Eindringen in die Harzkügelchen zu ermöglichen. Danach wurde die äquivalente Menge DCCI zugegeben. Lösungs- und Reaktionsmedium war Dichlormethan, für die Ankondensation von Asparagin, die als aktivierter Ester erfolgte, Dimethylformamid.

Tab. 2 Schema für einen Reaktionszyklus der Peptidsynthese am Festkörper

Reaktionsschritt	Operation	Zeit /Min./
1	3 x mit je 15 ml HOAc waschen	10
2	mit 15 ml 1 n HCl/HOAc schütteln	30
3	3 x mit je 15 ml HOAc waschen	10
4	3 x mit je 15 ml EtOH waschen	10
5	3 x mit je 15 ml DMF waschen	10
6	mit 15 ml 10% Et_3N in DMF schütteln	10
7	3 x mit je 15 ml DMF waschen	10
8	3 x mit je 15 ml CH_2Cl_2 waschen	10
9	mit 2 mMol Boc-AS in 4 ml CH_2Cl_2 schütteln	10
10	Zugabe von 2 mMol DCCI in 2 ml CH_2Cl_2	180
11	3 x mit je 15 ml CH_2Cl_2 waschen	10
12	3 x mit je 15 ml EtOH waschen	10

Für die Umsetzung mit Boc-AS-ONP in DMF entfallen die Schritte 8 und 10, CH_2Cl_2 im Schritt 11 wurde durch DMF ersetzt. Die Reaktionsdauer betrug 48 Stunden.

Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Reaktionsansatz von 0,5 mMol Boc-AS-Harz.

Die Carboxylkomponente wurde in einem Überschuß von vier Äquivalenten eingesetzt. Die Reaktionszeit für die Kondensationen betrug 3 Stunden, die für die Umsetzung mit Boc-Asn-ONP 48 Stunden.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid mittels Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure vom Träger abgespalten und als Rohprodukt in 85%iger Ausbeute, bezogen auf die erste Aminosäure, erhalten.

Die Aminosäureanalyse des Rohproduktes, bei der allerdings Cystein nicht bestimmt wurde, läßt bereits einen guten Syntheseverlauf erkennen.

Molares Verhältnis der Aminosäuren im Pentapeptid-Rohprodukt der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Ala in der S-diphenylmethylierten Form

Aminosäure	Theoretische Molzahl	Gefundene Molzahl
Ala	1,00	1,00
Phe	1,00	0,97
Asp	1,00	0,95
Glu	1,00	0,95

Die weiteren Untersuchungen zeigten, daß bei der Ablösung des Peptidderivates vom Träger mittels Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure nicht nur der Boc-Rest und der Glutaminsäure-γ-benzylester, sondern auch ein erheblicher Teil des S-Diphenylmethyl-Restes gespalten werden. Neben dem S-diphenylmethylierten Hauptprodukt Glu-Asn-Phe-Cys(Dpm)-Ala waren deshalb auch das ungeschützte Peptid derselben Sequenz sowie sein entsprechendes Disulfid als Nebenkomponenten im Rohprodukt zu erwarten. Der Anteil an deblockiertem Peptid betrug nach Bestimmung des Gehaltes an freien SH- und Disulfid-Gruppen nach CAVALLINI[85] ca. 30%.

Durch Dünnschichtchromatographie konnte das Rohprodukt in zwei verschiedenen Laufmittelsystemen (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24) in fünf Komponenten aufgetrennt werden.

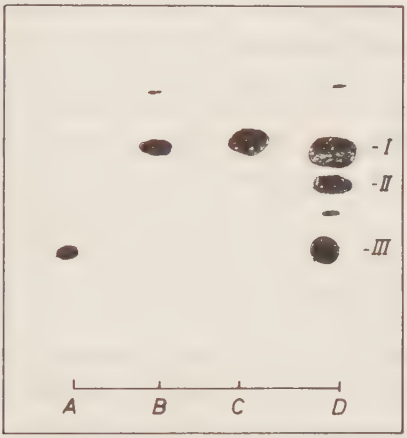


Abb. 6 Dünnschicht-Chromatogramm

Schicht: Kieselgel G, Fließmittel: Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24
A: Bis(Glu-Asn-Phe)-Cys_2-bis-Ala
B: Glu-Asn-Phe-Cys(Dpm)-Ala
C: Leu
D: Pentapeptid-Rohprodukt der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Ala

Neben dem Hauptfleck (S-diphenylmethyliertes Pentapeptid) konnten die zwei stärker ausgeprägten Nebenflecken als ungeschütztes Pentapeptid bzw. dessen Disulfid identifiziert werden.

Die Abtrennung des teilgeschützten Pentapeptids gelang durch präparative Dünnschichtchromatographie. Nach dem Entwickeln im Laufmittelsystem Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 konnte das Peptidderivat aus dem Sorptionsmittel, einer 2 mm dicken Kieselgelschicht, mit Eisessig eluiert werden.

Außerdem konnte das Peptid in größeren Mengen auf Grund seiner außerordentlich schlechten Löslichkeitseigenschaften von den ungeschützten Peptiden und kleineren Peptidbruchstücken abgetrennt werden.

Durch anschließende Behandlung mit siedender Trifluoressigsäure in Gegenwart eines Überschusses von Phenol wurde das geschützte Peptid in das Produkt mit freier SH-Gruppe übergeführt. Nach einer Spaltungsdauer von 30 Minuten betrug der Gehalt an freien SH-Gruppen nahezu 100%, dünnschichtchromatographisch konnten nur noch Spuren des SH-blockierten Peptids nachgewiesen werden. Die Hauptmenge des Produktes war jetzt dünnschichtchromatographisch mit dem Fleck II, Abb. 6, und nach Oxydation mit dem Fleck III, Abb. 6, identisch.

Eine zweite Reinigungsmöglichkeit bot sich darin an, daß das Rohprodukt sofort mit siedender Trifluoressigsäure/Phenol deblockiert und durch anschließende Oxydation in schwach alkalisch-wässriger Lösung in das entsprechende Cystinpeptid übergeführt wurde. Dieses Pentapeptid-Disulfid Bis-(Glu-Asn-Phe)-Cys_2-bis-Ala zeigte im Hinblick auf sein Molekulargewicht gute Voraussetzungen, um durch Gelfiltration an Sephadex G-15 gereinigt werden zu können (Abb. 7).

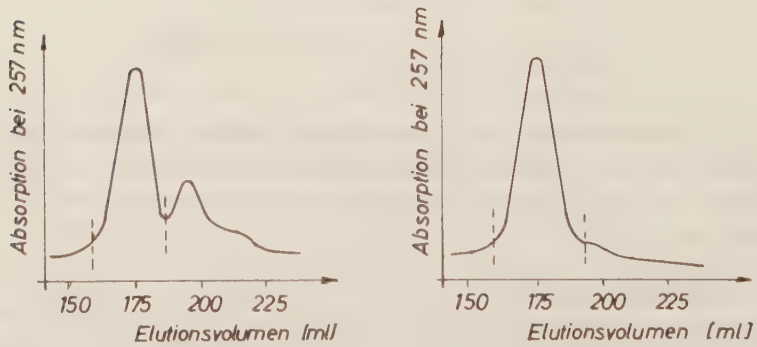


Abb. 7 Gelchromatographie an Sephadex G-15 in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat des Pentapeptid-Disulfids. Rechts: Rechromatographie.

Eine wiederholte Gelfiltration lieferte eine Substanz in großer Reinheit. Das Disulfid war dünnschichtchromatographisch in zwei Laufmittelsystemen (Fleck III, Abb. 6) einheitlich. Auch nach dem Anfärben mittels der außerordentlich empfindlichen Chlor-Tolidin-Methode[87,88] wurden keine Nebenflecken sichtbar. Die Ausbeute lag bei 70%, bezogen auf eingesetztes Rohprodukt, und ca. 60%, bezogen auf die bei der Synthese eingesetzte erste Aminosäure.

Nach der Oxydation mit Perameisensäure und anschließender Totalhydrolyse ergab sich für das molare Verhältnis der einzelnen Aminosäuren:

Aminosäure	Theoretische Molzahl	Gefundene Molzahl
Cys-SO_3^-	1,00	1,01
Asp	1,00	0,95
Glu	1,00	1,00
Ala	1,00	1,01
Phe	1,00	1,04

Die vorangehenden Ergebnisse zeigen, daß die Synthese des Pentapeptids der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Ala mit Hilfe der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD außerordentlich zufriedenstellend verlaufen ist.

Die hohen Ausbeuten von 85% für das Rohprodukt und 60% für das Peptiddisulfid, bezogen auf die eingesetzte erste Aminosäure, sowie der kurze Zeitaufwand von vier Tagen, der für die Synthese benötigt wurde, verdeutlichen, daß zumindest in diesem Fall die klassische Peptidsynthese einem Vergleich mit der hier angewendeten Methode nicht standhalten kann. Bei der Synthese nach dem sogenannten klassischen Verfahren, die an einem Pentapeptid ähnlicher Sequenz im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, war die Gesamtausbeute über alle Stufen nicht höher als 20%. Für die Synthesedauer war ein Zeitaufwand von mindestens 14 Tagen notwendig.

Außerdem konnte erstmals ein für die Festkörpersynthese neuer Thiolgruppenschutz erfolgreich eingeführt werden. Der besondere Vorteil des S-Diphenylmethyl-Restes gegenüber der sonst gebräuchlichen S-Benzylschutzgruppe liegt in seiner einfachen und mit geringem Zeitaufwand verbundenen Spaltbarkeit.

Ein schädigender Einfluß auf das Peptid und seine Bindungen durch siedende Trifluoressigsäure konnte nicht festgestellt werden.

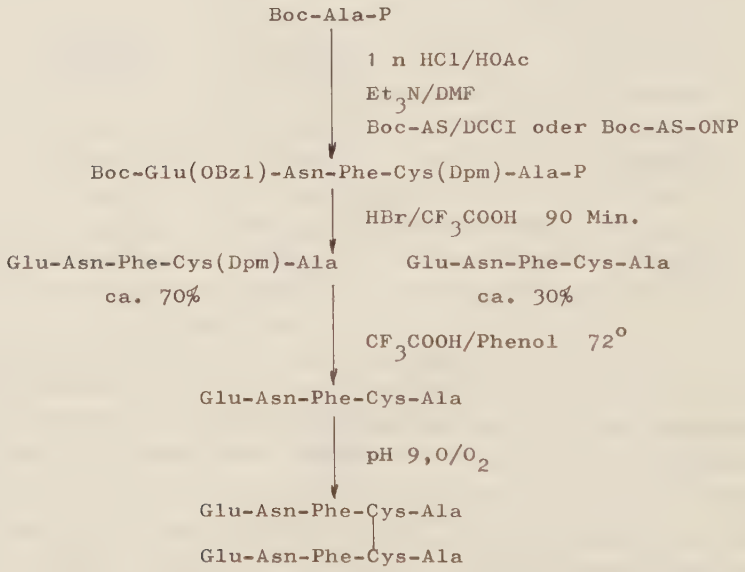


Abb. 8 Schematische Darstellung des S-diphenylmethylierten Pentapeptids mit Hilfe der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD und dessen Überführung in das entsprechende Disulfid.

2.2.2 Synthese der /Āla[12]/-A-Kette des Schafinsulins

Die Synthese dieser variierten A-Kette wurde im Prinzip genauso durchgeführt, wie es für das Pentapeptid der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Ala bereits ausführlich beschrieben wurde.

Zur Synthese wurden die folgenden Aminosäurederivate verwendet: Boc-Ala, Boc-Asn-ONP, Boc-Cys(Dpm), Boc-Gln-ONP, Boc-Glu(OBzl), Boc-Gly, Boc-Ile, Boc-Leu, Boc-Tyr(Bzl) und Boc-Val. Alle in die Peptidsynthese eingesetzten Aminosäurederivate konnten kristallisiert erhalten werden und entsprachen in ihren Schmelzpunkten und optischen Aktivitäten den Literaturwerten.

Als Träger diente ein selbst hergestelltes Copolymerisat aus Styrol/Divinylbenzol mit 1% Vernetzung. Die Chlormethylierung und die Anesterung des C-terminalen Asparagins erfolgte nach den von PEPPER et al.[77] bzw. von MERRIFIELD[30] angegebenen Verfahren. Der Chlormethylgruppengehalt und damit auch die Aminosäurebeladung wurden auf 2,1 mMol Cl/g bzw. 0,5 mMol Boc-Asparagin/g Harz erhöht.

In einer Synthese, die 20 Reaktionszyklen enthielt (s. Tab.2), wurde schließlich die variierte A-Kette aufgebaut. Wie bei der Synthese des beschriebenen Pentapeptids wurde das SHEEHAN-Reagenz zur Kupplung verwendet. Lediglich Asparagin und Glutamin wurden aus den bereits erwähnten Gründen als Boc-Aminosäure-p-nitrophenylester eingesetzt.

Das Peptid wurde mittels Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure vom Träger abgespalten und als Rohprodukt in 40%iger Ausbeute erhalten, bezogen auf die erste Aminosäure. Durch die acidolytische Einwirkung wurde gleichzeitig der größte Teil der Schutzgruppen des Peptids entfernt. So wurden der Boc-Rest der α-Aminogruppe, der Glutaminsäure-γ-benzylester und die Benzylätherbindung des Tyrosins vollständig entfernt. Wie die anschließende SH-Gruppenbestimmung zeigte, wurde der S-Diphenylmethyl-Rest des Cysteins dabei nach einer Reaktionsdauer von 90 Minuten zu etwa 30% gespalten.

Bevor die vollständige Deblockierung der SH-Gruppen mittels siedender Trifluoressigsäure unter Phenolzusatz vorgenommen wurde, sollte der Einfluß dieser Säure auf Rinderinsulin-A-Kette und Rinderinsulin geprüft werden.

Dies sollte vor allem deshalb geschehen, weil von HANSON und LAW[55], die bei einer Oxytocin-Synthese den 4,4'Dimethoxy-diphenylmethyl-Rest als SH-Schutz verwendeten, Bedenken gegenüber einer Behandlung von Peptiden mit siedender Trifluoressigsäure geäußert wurden. WEYGAND und Mitarbeiter[89] konnten dagegen keine schädigenden Einflüsse auf Aminosäurereste und Peptidbindungen von mit siedender Trifluoressigsäure behandelten Peptidderivaten feststellen. Diese Befunde wurden auch von ZERVAS und Mitarbeitern[54] bestätigt, und schließlich hatte die erfolgreiche Deblockierung des bereits in dieser Arbeit beschriebenen Pentapeptids keinerlei Schaden für das behandelte Peptid hinterlassen. Vermutlich ist bei der Klärung dieser Frage die Art der Aminosäurezusammensetzung des zu behandelnden Peptids und vor allem die Behandlungsdauer zu berücksichtigen.

In unseren Versuchen wurde deshalb die Sequenz der A-Kette des Rinderinsulins in ihrer stabilen Cysteinsäureform einem solchen Versuch ausgesetzt. Dazu wurde zunächst die Tetra-S-sulfonat-A-Kette des Rinderinsulins mit Perameisensäure oxydiert und dieses A-Ketten-Produkt dann 30 Minuten mit siedender Trifluoressigsäure behandelt.

In sich anschließenden elektrophoretischen und chromatographischen Untersuchungen konnte die Identität des behandelten A-Ketten-Produktes mit nicht behandelter perameisensäure-oxydierter A-Kette gezeigt werden. Im Elektropherogramm waren neben dem Hauptfleck zwei gerade noch erkennbare Nebenflecken sichtbar, während Dünnschichtchromatogramme in den Laufmittelsystemen Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1, Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 und Chloroform/Methanol/Wasser/Ammoniak 4:4:1:1 nach Anfärben mittels der Chlortolidin-Methode keine Nebenflecken aufwiesen. Auch waren keine gegenüber Ninhydrin positiven Flecken nachweisbar.

Rinderinsulin, das 30 Minuten in siedender Trifluoressigsäure gekocht wurde, zeigte im anschließenden biologischen Test annähernd vollständige biologische Aktivität.

Nach diesen Vorversuchen konnte ein relativ günstiges Verhalten von siedender Trifluoressigsäure gegenüber der A-Kette des Insulins erwartet werden. Daher wurden die SH-Gruppen des synthetischen A-Ketten-Produktes mittels siedender Trifluoressigsäure in Gegenwart eines Überschusses von Phenol deblockiert. Nach einer Spaltungsdauer von 15 Minuten betrug der SH-Gruppengehalt etwa 70% und nach 30 Minuten ca. 80%. Der Gehalt an freien SH-Gruppen konnte auch nach längerer Einwirkung des Spaltungsmittels nicht erhöht werden.

Dieser Befund läßt nun nicht unbedingt den Schluß zu, eine vollständige Deblockierung der SH-Gruppen sei unter den angewendeten Bedingungen nicht erzielt worden. Die Bestimmung der freien SH-Gruppen erfolgte nach der Methode von CAVALLINI[85]. Dabei geht in die Berechnung u.a. das Molekulargewicht der SH-geschützten Verbindung ein. Über das Molekulargewicht des vorliegenden A-Ketten-Produktes lassen sich jedoch aus zweierlei Gründen nur sehr ungenaue Angaben machen. Auf Grund der Aminosäureanalyse und der Endausbeute an Rohprodukt ist zu ersehen, daß die durchschnittliche Umsatzrate bei der Peptidsynthese nicht höher als 97% lag. Das Rohprodukt stellte deshalb ein Gemisch aus zahlreichen Peptiden unterschiedlicher Sequenz und Länge dar. Da nun in den Positionen A 7 und A 6, also am N-terminalen Ende der A-Kette, zwei der vier Cysteinreste stehen, ist ein relativ geringerer Anteil von Cystein gegenüber den am Beginn der Synthese eingeführten Aminosäuren zu erwarten. Außerdem wurde ein Teil der S-Diphenylmethylgruppen bereits während der Spaltung des Peptids vom Träger mit entfernt. Dieser Anteil betrug ca. 30% und führt zu einer weiteren Verfälschung des Molekulargewichtes.

Für die Berechnung des SH-Gruppengehaltes wurde das Molekulargewicht der noch 70% S-Diphenylmethylgruppen enthaltenden A-Kette zugrunde gelegt. Da der absolute Gehalt an Cystein und auch das mittlere Molekulargewicht des Rohproduktes nicht bekannt sind, kann durch die Ermittlung von 80% freien SH-Gruppen nach der Trifluoressigsäure/Phenol-Behandlung keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Peptid vollständig schutzgruppenfrei ist oder nicht. Die Tatsache, daß sich selbst nach mehrstündiger Spaltungsdauer der Gehalt an freien SH-Gruppen nicht erhöhte und auch ein Vergleich der Schwefelananlyse der SH-geschützten Kette mit der des später erhaltenen Buntesalzes sprechen für eine vollständige Deblockierung des Produktes.

Die ungeschützte A-Kette wurde in das Buntesalz übergeführt und dieses durch Gelfiltration an Sephadex G-25 in 0,02 M Ammoniumhydrogencarbonat entsalzt und gereinigt.

Die elektrophoretische Untersuchung dieses Produktes ergab ein uneinheitliches Bild. Es waren sieben paulypositive Banden sichtbar, von denen sich eine wie authentisches, aus Rinderinsulin isoliertes A-Ketten-Buntesalz verhielt.

Aus der Aminosäureanalyse ist zu ersehen, daß das durch Gelfiltration gereinigte Buntesalz einen großen Anteil an dem in seiner Sequenz der A-Kette entsprechenden Produkt enthalten mußte. Der relativ hohe Anteil an Glycin zeigt außerdem, daß eine Spaltung von N-terminalem Glycin oder kürzeren Peptiden durch siedende Trifluoressigsäure höchstens in geringem Maße erfolgt sein konnte. Auf einen guten Verlauf der Synthese mit Boc-Cys(Dpm) deutet die Schwefelanalyse der Sulfonat-Kette hin.

Das erhaltene Buntesalz wurde mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette nach dem von KATSOYANNIS und Mitarbeitern[89] angegebenen Verfahren zum entsprechenden Hybridinsulin kombiniert. Dabei wurde das zur Reduktion der Sulfonatgruppen verwendete Mercaptoäthanol durch kontinuierliche Extraktion mit Essigester unter Stickstoff entfernt. Die Aktivität

wurde nach der Kombination direkt in der erhaltenen Lösung bestimmt und auf die eingesetzte B-Kette bezogen.

Enttäuschend waren die erhaltenen Aktivitäten, die im Mäusefalltest zu 0,35% und im Fettkörpertest zu 0,37% bestimmt wurden. Sie lagen damit um 50% unter den Aktivitäten, die durch Synthese der A-Kette nach demselben Verfahren, aber unter Verwendung des Benzylrestes als Thiolgruppenschutz erhalten wurden[56].

2.2.3 Synthese der [Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}, Ala^{21}]-A-Kette des Schafinsulins

Die Synthese dieser stark variierten A-Kette wurde ebenfalls mit Hilfe der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD unter Verwendung des S-Diphenylmethyl-Restes als Thiolgruppenschutz durchgeführt. Die vorliegende Sequenz war deshalb besonders geeignet, weil sie in ihrem C-terminalen Sequenzanteil mit dem bereits beschriebenen Pentapeptid identisch ist, dessen Darstellung sehr zufriedenstellend verlaufen war. Außerdem sollte sich der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin als vorteilhaft erweisen. Die Aminosäureanalysen der [Ala^{12}]-A-Kette zeigen sehr geringe Werte für Tyrosin an, welches unter den gegebenen Hydrolysebedingungen auf einer teilweisen Zersetzung, unvollständigen Spaltung des Benzyläthers oder auf Nebenreaktionen dieser Aminosäure mit dem bei der Spaltung des Diphenylmethyl-Restes auftretenden Diphenylmethyl-Kations beruhen kann. Schließlich kann auch an eine schlechte Ankondensation von Tyrosin während der Peptidsynthese gedacht werden.

Da nach unseren Erfahrungen Phenylalanin bei der Festkörpersynthese gut ankondensiert und diese Aminosäure bei der Hydrolyse keine Zersetzungs- und Nebenreaktionen zeigt, sollte die Synthese einer so variierten A-Kette ein besseres Bild in bezug auf den Syntheseablauf vermitteln.

Die Synthese dieser variierten A-Kette wurde analog der bereits beschriebenen Peptidsynthesen am Festkörper durchgeführt. Als Träger diente das käufliche chlormethylierte Copolymerisat mit 2% Vernetzung. Die Aminosäurebeladung betrug 0,25 mMol Boc-Alanin/g Harz.

Erstaunlich hoch war die erhaltene Rohausbeute von ca. 55% nach der Abspaltung des Peptids vom Träger. Berücksichtigt man noch die relativ gute Aminosäureananlyse diese Produktes, so konnte der Ablauf der Synthese als zufriedenstellend angesehen werden.

Molares Verhältnis der Aminosäuren in synthetischer $[Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}, Ala^{21}]$-A-Kette des Schafinsulins in der S-diphenylmethylierten Form

Aminosäure	Theoretische Molzahl	Gefundene Molzahl
Asp	1,00	1,00
Glu	4,00	3,17
Gly	2,00	1,58
Ala	3,00	2,80
Val	2,00	1,44
Ile	1,00	0,65
Leu	2,00	2,00
Phe	2,00	2,00

Das A-Ketten-Produkt wurde nach Abspaltung der Thiolschutzgruppen mittels siedender Trifluoressigsäure unter Phenolzusatz durch Sulfitolyse in das entsprechende Buntesalz übergeführt und an Sephadex G-25 entsalzt und gereinigt, s. Abb.9.

Die Hauptfraktion an salzfreiem Lyophilisat betrug 65%, bezogen auf eingesetztes ungeschütztes A-Ketten-Produkt. Die Gesamtausbeute über alle Synthesestufen und sich anschließenden Operationen betrug somit ca. 35%, bezogen auf die bei der Synthese eingesetzte erste Aminosäure.

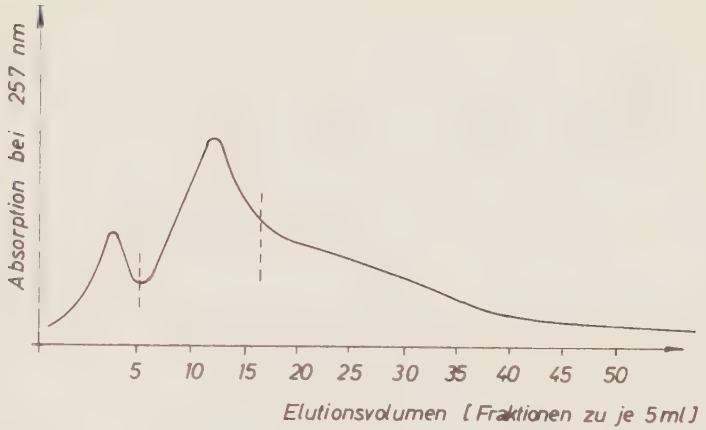


Abb. 9 Elutionsdiagramm der Tetra-S-sulfonat-A-Kette an einer Sephadex-G-25-Säule (3,8 x 72 cm).
Eluant: 0,05 M NH_4HCO_3-Lösung.
Durchfluß: 80 ml/h

Trotz des guten Syntheseverlaufes und der zufriedenstellenden analytischen Ergebnisse (s. Beschreibung der Versuche) wurde nach Kombination des Tetra-S-sulfonates mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette im Mäusefalltest eine Aktivität von nur ca. 0,1% erhalten.

3. Beschreibung der Versuche

3.1 Analytische Methoden

3.1.1 Allgemeine analytische Methoden

Papierchromatographie

Verwendet wurden die aufsteigende Chromatographietechnik und die Rundfilterchromatographie. Als Laufmittel diente Butanol/Eisessig/Wasser Vol%: 4:1:1.
Indikator: Ninhydrin als 5%ige Lösung in einem Gemisch aus 95 Teilen n-Butanol und 5 Teilen 2 n Essigsäure.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Als Schichtunterlage dienten Glasplatten von 20 x 20 cm und 20 x 5 cm. Das Sorptionsmittel war Kieselgel G nach STAHL, das in wässriger Aufschlämmung mit Hilfe des von STAHL entwickelten beweglichen Streichgerätes auf die Trägerscheiben gestrichen wurde. Für analytische Zwecke wurde eine Schichtdicke von 0,25 mm, für präparative Arbeiten von 2 mm gewählt. Die Kieselgelplatten wurden 2 Stdn. bei 120° und einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet. Außerdem wurden Fertigfolien mit Fluorescenzzusatz MN-POLYGRAM ^{R} der Firma Macherey-Nagel & Co., Düren, verwendet. Das Sorptionsmittel war Kieselgel S-HR/UV$_{254}$.

Die Chromatogramme wurden in speziell für die DC hergestellten Trögen (Format 21 x 21 x 9 cm) mit plangeschliffenem Ganzglasdeckel mit Knopf entwickelt. Die Kammern waren durch Filterpapierauskleidung mit dem Fließmittel gesättigt.

Das Sichtbarmachen der farblosen Substanzen erfolgte mit geeigneten Anfärbereagenzien, die auf die DC aufgesprüht wurden. Fluorescierende und fluorescenzlöschende Flecke auf fluorescierenden Trennschichten konnten unter der UV-Lampe festgestellt werden.

Die Wanderungsweite der Substanzen wurde durch R_f-Werte festgelegt. Da auch bei genauer Registrierung aller experimenteller Daten die Wanderungsgeschwindigkeit von schwer

reproduzierbaren Faktoren abhängt, wurde der relative R_f-Wert zu Leucin R_{Leu} angegeben.

Laufmittel: (A) Butanol/Eisessig/Wasser Vol%: 4:1:1
(B) Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser Vol%: 30:20:6:24
(C) Chloroform/Methanol/Wasser/Ammoniak Vol%: 4:4:1:1

Indikatoren: 1) Ninhydrin als 5%ige Lösung in einem Gemisch aus 95 Teilen n-Butanol und 5 Teilen 2 n Essigsäure.
2) Chlortolidin.
Chlorierung: Das Chromatogramm wurde in eine chlorgesättigte Kammer für 10 Minuten eingestellt und anschließend der Überschuß an Chlor durch Ammoniakdämpfe entfernt.
Sprühlösung: 160 mg o-Tolidin wurden in 30 ml Eisessig gelöst und diese Lösung in einem 500 ml Meßkolben mit dest. Wasser aufgefüllt und 1 g Kalumjodid zugefügt.

Für präparative Arbeiten wurden die gelösten Substanzen mit einer Kapillare bandförmig auf die Sorptionsschicht aufgetragen. Nur ein schmaler Streifen wurde nach dem Entwickeln nach Abdecken des übrigen Teiles mit einer Folie sichtbar gemacht. Die substanzhaltigen Zonen wurden dann mit einer Rasierklinge von der Glasplatte abgehoben. Schließlich wurden die Substanzen aus dem Sorptionsmittel mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert.

Papierelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden in einer SHANDON-Elektrophoresekammer durchgeführt.
Als Pufferlösung diente: 10% Essigsäure, 15% Ameisensäure in 4 M Harnstoff, pH 1,9.

Laufzeit: 5 bis 12 Stdn.
Spannung: 2oo V
Sprühreagenz: Das Anfärben erfolgte nach dem Trocknen an der Luft mit einer frisch bereiteten Lösung von Pauly's Reagenz (ca. 100 mg diazotierte Sulfanilsäure in 20 ml 5%iger Sodalösung gelöst).

Gelchromatographie

Bei der Gelchromatographie wurde die Absorption des Eluates bei 257 nm mit Hilfe des Durchlaufphotometers Uvicord der Firma LKB-Produkter AB, Stockholm, kontinuierlich verfolgt und durch einen Schreiber, Typ LKB, registriert.

Quantitative Aminosäureanalyse

Die Peptide wurden 24, 48 oder 72 Stdn. mit 6 n HCl unter Stickstoffatmosphäre in zugeschmolzenen Spezialreagenzgläsern bei 110° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde in ein Spitzkölbchen überführt, im Vakuum zur Trockene eingeengt und über KOH/P_2O_5 getrocknet. Die Aminosäureanalysen wurden in einem Unichrom Amino Acid Analyzer der Firma Beckman Instruments GmbH, München, durchgeführt.

Elementaranalysen

Die Stickstoff- und Schwefelbestimmungen wurden im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen ausgeführt.
Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der Methode von DUMAS. Die Schwefelbestimmung erfolgte durch Veraschung nach SCHÖNINGER, die Sulfatbestimmung durch Leitfähigkeitsmessung nach PFUNDT.

Schmelzpunkte

Alle Schmelz- oder Zersetzungspunkte wurden mit dem Apparat nach Tottoli der Firma Büchi, Schweiz, ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

Spezifische Drehwerte

Die Drehwerte wurden mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter der Firma CARL ZEISS, Oberkochen/Württ., gemessen.

3.1.2 SH-Gruppen-Bestimmung nach CAVALLINI[85]

Diese Methode erlaubt es, den prozentualen Anteil ungeschützter Schwefelgruppen, der sich aus freien SH- und aus Disulfid-Gruppen zusammensetzt, quantitativ zu bestimmen.

Je nach Molekulargewicht und Anzahl der Schwefelgruppen pro Molekül wurde eine kleine Probe des Peptids (für die A-Kette ca. 200 - 400 µg) eingewogen und in 2,5 ml 6 M Harnstofflösung gelöst. Waren die Substanzen auf Anhieb darin nicht gut löslich, so wurde zunächst mit wenig Natronlauge (pH 9-10) in Lösung gebracht. Danach wurden 0,1 ml Komplexonlösung und 25 mg Natriumborhydrid zugegeben, umgeschüttelt und zur Reduktion der Disulfid-Gruppen 30 Min. lang bei 38° im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Natriumborhydrid durch Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer (1 M KH_2PO_4 in 0,2 n HCl) und nach 5 Min. durch Zugabe von 2 ml Aceton zerstört. Um auch letzte Spuren des Reduktionsmittels zu zerstören, wurde sorgfältig umgeschüttelt. Darauf wurde 5 Min. mit Stickstoff begast, 0,5 ml 0,01 M DTNB-Lösung in Aceton zugegeben, mit bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und nochmals mit Stickstoff 2 Min. lang begast. Nach 15 Min. wurde die Extinktion bei 412 mµ gegen dest. Wasser gemessen.

Die Auswertung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$N = \frac{MG \cdot E \cdot Vol}{12\,000 \cdot mg}$$

dabei ist:

N	=	Zahl der ungeschützten Schwefelatome pro Molekül
MG	=	Molekulargewicht des Peptids
E	=	Δ E
Vol	=	Volumen der Probe (10 ml)
12 000	=	molarer Extinktionskoeffizient
mg	=	Einwaage in mg

Je nach Anzahl der Schwefelatome pro Molekül erhält man den prozentualen Anteil der ungeschützten S-Gruppen zu:

$$\text{ungeschützte S-Gruppen in \%} = \frac{N \cdot 100}{\text{Anzahl S}}$$

3.1.3 Der Mäusefalltest

Der Test wurde nach dem von YOUNG und LEWIS[90] beschriebenen Verfahren durchgeführt, allerdings mit der Veränderung, daß mit nüchternen Mäusen und bei 30° gearbeitet wurde. Unter diesen Bedingungen reagieren die Tiere empfindlicher.

Die Mäuse wurden intraperetoneal gespritzt. Normalerweise wurden 0,1 ml injiziert, und zwar mit einer graduierten Tuberculinspritze und feinen Kanülen (Größe 20).

Für jede einzelne Bestimmung wurden 10 Mäuse (eine Gruppe) benutzt. Diese wurden nach der Injektion in schräg stehende, langsam rotierende Maschendrahtzylinder gesetzt. Fiel eine Maus innerhalb der ersten 8 Min. aus dem Zylinder, so wurde sie bezeichnet und wieder hineingesetzt. Mäuse, die innerhalb dieser Vorzeit ein zweites Mal herunterfielen, wurden aus dem Test genommen. Nach ungefähr 25 Min. begann das eingespritzte Insulin zu wirken und infolge der starken Blutzuckersenkung konnten sich die Mäuse nicht mehr am Maschengitter halten und fielen aus dem Zylinder. Eine Stunde nach der Injektion wurde die Anzahl der gefallenen Mäuse gezählt. Zu Beginn der Tests wurde für die Eichkurve Rinderinsulin gespritzt. Dabei lagen die Dosen zwischen 0,2 und 1,6 γ/Maus. Mindestens 5 verschiedene Insulindosen innerhalb des angegebenen Bereiches wurden für eine Eichkurve gespritzt, wobei bei 1,6 γ/Maus im allgemeinen alle 10 Mäuse einer Gruppe fielen.

Nach Ermittlung der Werte für die Eichkurve wurde mit der Testung der Lösung mit unbekanntem Insulingehalt begonnen. Die Verdünnung dieser Testlösung war richtig, wenn zwischen 4 und 8 Mäuse fielen. Wegen der großen Fehlerbreite dieses biologischen Testes wurde die Testlösung mindestens an 5 Mäusegruppen geprüft und der Test zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt.

Bei der Aufstellung der Eichkurve wurde die Anzahl der gefallenen Mäuse pro Gruppe gegen die Insulindosis pro Maus

aufgetragen. Die Aktivität des Kombinationsproduktes wurde aus dem Verhältnis von gefundener Insulinaktivität und der errechneten Menge Insulin, die auf Grund der eingesetzten B-Kette maximal entstehen konnte, errechnet.

3.2 Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe

L-Aminosäuren wurden in der von den Firmen Ajinomoto Co., Merck und Serva gelieferten Reinheit benutzt.

Ammoniak:
Wurde aus einer Stahlflasche entnommen. Reinheitsgrad des technischen Produktes ca. 99%.
Chlorameisensäureäthylester:
Wurde vor Gebrauch destilliert, Firma Fluka AG, Buchs, Schweiz.
Chromatographie- und Elektrophoresepapier:
Nr. 2043 b mgl., Firma Schleicher & Schüll.
Dialysierschlauch:
Visking-Dialysierschlauch Typ 20/32 Nr. 44120 aus dem Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.
DTNB:
Reinst, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.
Eisessig:
Chem. rein, über Acetanhydrid destilliert.
Dicyclohexylcarbodiimid:
Zur Synthese, von den Firmen Fluka AG und Merck AG.
Hexamethylphosphorsäuretriamid:
Wurde bei 3-4 Torr destilliert.
HBr/Eisessig:
Zur Synthese, 40%ig, Firma Merck AG, Darmstadt.
Insulin:
Kristallines Rinderinsulin der Firma Hoechst, 27,0 I.E./mg, Zinkgehalt ca. 0,3%.
2-Mercaptoäthanol:
Puriss. p.a., Firma Fluka AG, Buchs, Schweiz.
Merrifield Polymer:
2,2% Cl, Firma Fluka AG, Buchs, Schweiz.

Natrium:
In Stücken, ohne Reinheitsgrad.
Natriumtetrathionat:
Nach Gmelin-Kraut, Handbuch der anorg. Chemie, Bd. II, hergestellt, bei 0^{o} mindestens 1 Jahr haltbar.
p-Nitrophenol:
Von der Firma Hoechst, wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus 5%iger HCl unter Zusatz von Aktivkohle gereinigt.
Sephadex:
Sephadex-Gel G 10, G 15 und G 25 fine von der Firma Pharmacia, Uppsala.
tert.-Butyloxycarbonyl-hydrazid:
Zur Synthese, Firma Merck AG, Darmstadt.
Triäthylamin:
Wurde über Kalumhydroxyd-Plätzchen getrocknet und anschließend über eine Kolonne destilliert.
Trifluoressigsäure:
Reinigung über das Bariumsalz. Freisetzung mit konz. Schwefelsäure und Destillation. Firma Merck AG, Darmstadt.

Die Lösungsmittel Äther, Äthanol, Dichlormethan, Dioxan, Essigester und Tetrahydrofuran wurden vor Gebrauch destilliert, das Absolutieren erfolgte nach üblichen Verfahren. Dimethylformamid wurde durch azeotrope Destillation eines ternären Gemisches aus DMF/Benzol/Wasser 85:15:4 gereinigt.

3.3 Allgemeine Synthesen

Synthese der Benzyloxycarbonyl-aminosäuren

Die Darstellungen und Eigenschaften von Benzyloxycarbonyl-aminosäuren sind in der Literatur ausführlich beschrieben (s. Beschreibung der Experimente).

Zumeist wurden die Aminosäuren oder deren Derivate in alkalischer Lösung unter Eiskühlung und starkem Rühren durch Zutropfen von Benzyloxycarbonyl-chlorid und äquivalenten Mengen Natronlauge umgesetzt. Die optimalen pH-Bereiche liegen für die einzelnen Aminosäuren zwischen pH 9 und pH 12. Da die meisten Z-Aminosäuren sich durch gute Löslichkeitseigenschaften in organischen Lösungsmitteln auszeichnen, wurden sie dementsprechend im allgemeinen, nach Ansäuern der wässrigen Reaktionslösung mit Salzsäure auf pH 3-4, mit Essigester extrahiert. Nach Aufarbeitung der Aminosäurederivate konnten diese zumeist aus Essigester/Petroläther in guten Ausbeuten rekristallisiert werden (z.B. Z-Ala, Z-Val, Z-Phe, Z-Tyr(Bzl)).

Die in dieser Arbeit dargestellten Z-Aminosäuren wurden durch Schmelzpunkt und Drehwert auf ihre Reinheit geprüft, bevor sie in die Peptidsynthese eingesetzt wurden.

Synthese der tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren

Die Boc-Aminosäuren und deren Derivate wurden nach SCHNABEL[86] durch Acylierung mit tert.-Butyloxycarbonylazid bei einem vorgegebenen, für die einzelnen Aminosäuren verschiedenen alkalischen pH (zwischen pH 9 und pH 12) im Autotitrator in guten Ausbeuten dargestellt.

Die Aufarbeitung erfolgte im allgemeinen durch Ansäuern mit fester Citronensäure (pH 3-4) und Extraktion der Aminosäurederivate mit Essigester. Nach Waschen und Abziehen des Lösungsmittels wurde entsprechend den Löslichkeitseigenschaften der einzelnen Boc-Derivate aus organischen Lösungsmittelgemischen unterschiedlichster Art rekristallisiert. In einigen Fällen wurde zusätzlich eine Reinigung über die DCHA-Salze durchgeführt.

Darstellung der p-Nitrophenylester von Benzyloxycarbonyl-aminosäuren

Zu einer 0,2 - 0,5 molaren Lösung der Z-Aminosäuren in Essigester wurde p-Nitrophenol in 20%igem Überschuß zugegeben. In diese Lösung wurde die berechnete Menge DCCI, gelöst in einigen ml Essigester, unter Rühren bei 0° eingegossen, nach 30 Min. die Mischung langsam auf Raumtemperatur gebracht und dort noch eine Stunde stehen gelassen. Der Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt und mit Essigester gründlich nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden zur Trockene eingeengt und der Ester im Anschluß daran in siedendem Äthanol aufgenommen und gekühlt. Nach einiger Zeit schieden sich die p-Nitrophenylester der Z-Aminosäuren in großer Reinheit und guten Ausbeuten ab.

Für Z-Asn und Z-Gln wurde als Lösungsmittel Dimethylformamid verwendet. Hier schieden sich die Ester beim Verdünnen der Lösung mit Wasser kristallin ab. Eine wirksame Reinigung dieser Produkte war durch zweimaliges Umkristallisieren aus Dimethylformamid/Wasser gegeben.

Peptidsynthese mit p-Nitrophenylestern

Das durch Decarbobenzoxylierung aus 11 mMol geschützten Peptids gewonnene Hydrobromid wurde in 20 - 30 ml Dimethylformamid gelöst, auf - 10° gekühlt und nacheinander mit 4,5 ml (32 mMol) Triäthylamin, 0,7 ml Eisessig und 10 mMol des Z-Aminosäure-ONP (gelöst in 5-10 ml Dimethylformamid) versetzt. Danach wurde 2 Tage bei 0° stehen gelassen. Die Aufarbeitung des Peptids erfolgte durch Eingießen in mit der äquivalenten Menge Salzsäure angesäuertes Eiswasser (200 - 500 ml) oder durch Eingießen in 1 n Kaliumhydrogencarbonatlösung. Das ausgefallene Peptidderivat wurde abgesaugt, mit 1 n Kaliumhydrogencarbonatlösung oder 1 n Ammoniak und Wasser bis zur Farblosigkeit gewaschen. Schließlich wurde mit 1 n HCl und Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen und entsprechend den Löslichkeitseigenschaften umkristallisiert oder umgefällt. In manchen Fällen

konnten Di- und Tri-Peptidderivate aufgrund einer relativ guten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln mit Essigester aus dem Reaktionsansatz extrahiert werden. Nach entsprechender Aufarbeitung wurden daraus sehr reine Produkte erhalten.

3.4 Synthese der [Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}]-A-Kette des Schafinsulins (Fragmentkondensation)

Benzyloxycarbonyl-glycyl-isoleucyl-valyl-glutamyl-γ-tert.-butylester-glutaminyl-S-benzyl-cysteinyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-glycin (I)

a) Bereitung der Aminkomponente

1 g Z-Gln-Cys(Bzl)-Cys(Bzl)-Ala-Gly[70] wurde in 15 ml 2 n HBr in Eisessig gelöst und die Lösung 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde in 200 ml Äther eingegossen, das ausgefallene Salz gründlich mit Äther gewaschen und im Vakuum über P_2O_5/KOH getrocknet. Das trockene Peptid-Hydrobromid wurde in 16 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid und 4 ml Dimethylformamid gelöst und zur Freisetzung des Amins mit 0,5 ml Triäthylamin versetzt.

b) Bereitung des Azides

Die Lösung von 1 g (1,6 mMol) Z-Gly-Ile-Val-Glu(OBu^t)-N_2H_3[70] in 25 ml Dimethylformamid wurde auf - 15° gekühlt und mit 2 ml 2 n HCl versetzt. Nach tropfenweiser Zugabe von 1 ml in Wasser gelösten 110 mg Natriumnitrit wurde nach 10 Min. das Reaktionsgemisch in 200 ml halbgesättigte Natriumchloridlösung eingegossen, 30 Min. stehen gelassen, das Azid abgesaugt und reichlich mit Wasser gewaschen.

c) Kondensation

Das in 30 ml Dimethylformamid gelöste Azid wurde bei - 10° mit der Lösung der Aminkomponente vereinigt. Der Ansatz wurde 2 Tage bei 0° und einen Tag bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurde das Peptid durch Einrühren in 300 ml einer gesättigten Kochsalzlösung und Ansäuern mit Essigsäure auf pH 4 gefällt, die Fällung nach mehrstündigem Stehen abgesaugt und gründlich mit Wasser und Methanol gewaschen. Das Produkt wurde zwecks Reinigung mit Methanol ausgekocht.

Ausbeute: 700 mg = 45% d. Th.

Schmp.: 245-249°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{25}$ = - 52,1° (c = 1 in Ameisensäure)

Elementaranalyse: $C_{60}H_{84}O_{15}N_{10}S_2$ (1249,5)

ber.: N 11,21 S 5,13

gef.: N 11,25 S 5,15

Aminosäureanalyse:

Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 48 Stdn.)

	Glu	Gly	Ala*	Val	Ile	Cys(Bzl)
theor.:	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00
gef.:	1,85	2,05	1,00	0,68	0,75	1,95

* bezogen auf Alanin

Eine Probe wurde decarbobenzoxyliert und papierchromatographisch untersucht. Das Produkt erwies sich als einheitlich.

R_f = 0,7 Laufmittel (A)

Benzyloxycarbonyl-S-benzyl-cysteinyl-alanin-methylester (II)

4,2 g (60 mMol) Alaninmethylesterhydrochlorid wurden nach Lösen in 30 ml Dimethylformamid mit 2 ml Triäthylamin versetzt und vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 1,2 ml Eisessig und 11,6 g (25 mMol) Z-Cys(Bzl)-ONP[91] versetzt. Nach zweitätigem Stehen bei Raumtemperatur rührte man den Ansatz in 800 ml Wasser ein. Der kristalline Niederschlag wurde abgesaugt, gründlich mit 1 n Ammoniak und Wasser gewaschen, getrocknet und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 9,1 g = 80% d. Th.

Schmp.: 129-130°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_D^{25} = -40{,}4°$ (c = 2 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{22}H_{26}N_2O_5S$ (430,5)

ber.: N 6,52
gef.: N 6,58

Das decarbobenzoxylierte Peptid war dünnschichtchromatographisch einheitlich.

Benzyloxycarbonyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-alanin-methylester (III)

25,8 g (60 mMol) Z-Cys(Bzl)-Ala-OMe wurden in 100 ml 2 n HBr/Eisessig 1 Stde. bei Raumtemperatur decarbobenzoxyliert. Danach wurde der größte Teil des Eisessigs abdestilliert, die verbleibende Lösung in 500 ml Äther eingegossen und der ausgefallene klebrige Niederschlag mit frischem Äther gut nachgewaschen. Nach Trocknen über KOH/P_2O_5 wurde das Peptid-Hydrobromid in 60 ml Dimethylformamid gelöst, mit 14 ml Triäthylamin versetzt und vom Triäthylammoniumbromid abfiltriert. Nach Zusatz von 6 ml Eisessig wurde die Lösung des Amins mit 19 g (51 mMol) Z-Val-ONP[81,92] umgesetzt.

Nach dreitägigem Stehen bei Raumtemperatur wurde durch Einrühren in 2 l Wasser gefällt, mit 1 n Ammoniak und Wasser gewaschen und getrocknet.

Rekristallisation aus Essigester/Äthanol.

Ausbeute: 9 g = 60% d. Th.

Schmp.: 170-172°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_D^{25}$ = - 30,8° (c = 2 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{27}H_{35}N_3O_6S$ (529,7)

ber.: N 7,94
gef.: N 8,28

Eine Probe wurde vom Z-Rest befreit. Das Peptid-Hydrobromid war dünnschichtchromatographisch einheitlich.

Benzyloxycarbonyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-alanin-hydrazid (IV)

Die Lösung von 5,3 g (10 mMol) Z-Val-Cys(Bzl)-Ala-OMe in 50ml Dimethylformamid wurde mit 6 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach 3 Tagen wurde die Lösung des Hydrazids in 1 l Wasser eingerührt, abgesaugt und mit Wasser und Methanol gewaschen.

Ausbeute: 5,1 g = 96% d. Th.

Schmp.: 222-224°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_D^{25}$ = - 43,0° (c = 1 in Ameisensäure)

Elementaranalyse: $C_{26}H_{35}N_5O_5S$ (529,7)

ber.: N 13,21
gef.: N 12,84

Benzyloxycarbonyl-glutaminyl-leucin-methylester[58] (V)

Zu einer Lösung von 11,8 g (65 mMol) Leu-OMe·HCl in 40 ml Dimethylformamid und 8,6 ml Triäthylamin wurden unter Rühren 24,3 g (60 mMol) Z-Gln-ONP zugegeben und die Reaktionslösung 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde mit 4 ml 1 n Ammoniak versetzt und nach einer Stde. Rühren 500 ml Essigester zugegeben. Nun wurde die Lösung abwechselnd mit 1 n Ammoniak und Wasser so lange gewaschen, bis die wässrige und die Essigester Phase farblos waren. Es wurde mit HCl neutralisiert, nochmals mit Wasser gründlich gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Peptidderivat wurde abgesaugt, getrocknet und aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 19,7 g = 80% d. Th.

Schmp.: 163-164°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_D^{25}$ = - 10,9° (c = 1 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{20}H_{29}N_3O_6$ (407,48)

ber.: N 10,30
gef.: N 10,28

Das decarbobenzoxylierte Produkt war papierchromatographisch einheitlich.

Benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucin-methylester (VI)

14 g (0,035 Mol) Z-Gln-Leu-OMe[58] wurden in 100 ml 2 n HBr/Eisessig 1 Stde. bei Raumtemperatur decarbobenzoxyliert. Der Eisessig wurde im Vakuum weitgehend abdestilliert und die verbleibende Lösung in 500 ml Äther eingegossen. Das Peptid-Hydrobromid wurde gründlich mit Äther gewaschen und über P_2O_5/KOH getrocknet. Anschließend

wurde das Salz in 100 ml Dimethylformamid gelöst, mit 9 ml Triäthylamin versetzt, vom Triäthylammoniumbromid abfiltriert und die Lösung mit 13 g (10% molarer Unterschuß) Z-Phe-ONP[90] versetzt. Nach 24 Stdn. wurde die klare Lösung in 1 l Essigester eingegossen und diese Lösung bis zur Farblosigkeit abwechselnd mit 1 n Ammoniak und Wasser gewaschen. Anschließend wurde noch mit 1 n HCl und gründlich mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und der Essigester bis auf ein Viertel seines Volumens eingeengt. In der Kälte fiel das Peptidderivat aus, es wurde abgesaugt und getrocknet.

Rekristallisation aus Essigester/Petroläther und Methanol/Wasser.

Ausbeute: 13 g = 80% d. Th.

Schmp.: 214-216°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{23} = -26{,}4°$ (c = 1 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{29}H_{38}N_4O_7$ (554,7)

ber.: N 10,10
gef.: N 10,28

Eine Probe wurde decarbobenzoxyliert und dünnschichtchromatographisch geprüft. Das Produkt erwies sich als einheitlich.

$R_{Leu} = 1{,}2$ Laufmittel (A)

Benzyloxycarbonyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucin-methylester (VII)

5,5 g Z-Phe-Gln-Leu-OMe (10 mMol) wurden in 50 ml 2 n HBr/Eisessig 1 Stde. bei Raumtemperatur decarbobenzoxyliert. Danach wurde die Lösung im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rest in 300 ml Äther eingegossen. Das Peptid-Hydrobromid wurde gründlich mit Äther gewaschen und über KOH/P_2O_5 getrocknet.

Das Salz wurde in 30 ml Dimethylformamid gelöst und mit 3,6 ml Triäthylamin versetzt. Nach Abfiltrieren des Triäthylammoniumbromids wurden zu der Lösung 3,6 g (10 mMol) Z-Leu-ONP[95] gegeben. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung in 500 ml eiskalte 1 n Ammoniaklösung unter Rühren eingegossen. Das gefällte Peptidderivat wurde abgesaugt und bis zur Farblosigkeit gründlich mit 1 n Ammoniaklösung, Wasser und schließlich mit 1 n HCl und nochmals mit Wasser gewaschen. Es wurde über KOH/P_2O_5 getrocknet.

Rekristallisation aus Äthanol/Wasser.

Ausbeute: 5,4 g = 82% d. Th.

Schmp.: 243-245°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{23}$ = 38,1° (c = 1 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{35}H_{49}N_5O_8$ (667,82)

ber.: N 10,49
gef.: N 10,56

Das decarbobenzoxylierte Produkt war dünnschichtchromatographisch einheitlich.

R_{Leu} = 1,3 Laufmittel (A)

Benzyloxycarbonyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucin-hydrazid (VIII)

6,7 g (10 mMol) Z-Leu-Phe-Gln-Leu-OMe wurden in 70 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 7 ml Hydrazinhydrat wurde 2 Stdn. bei 70° gerührt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Aufarbeitung des gebildeten Hydrazids erfolgte durch Eingießen in 500 ml Wasser. Das dabei ausgefallene Peptidderivat wurde abgesaugt, mit Wasser, Methanol und Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 6 g = 90% d. Th.

Schmp.: 258-260°

Elementaranalyse: $C_{34}H_{49}N_7O_7$ (667,8)

ber.: N 14,67

gef.: N 14,60

Benzyloxycarbonyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucin-methylester (IX)

a) Bereitung der Aminkomponente

1,5 g (2,2 mMol) Z-Leu-Phe-Gln-Leu-OMe wurden in 20 ml 2 n HBr/Eisessig gelöst und 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Salz in 200 ml Äther eingegossen, gründlich mit Äther gewaschen und über KOH/P_2O_5 getrocknet. Das trockene Hydrobromid wurde in 10 ml Dimethylformamid gelöst und zur Freisetzung des Amins mit 0,4 ml Triäthylamin versetzt.

b) Bereitung des Azides

Die Lösung von 1,1 g (2 mMol) Z-Val-Cys(Bzl)-Ala-N_2H_3 in 4 ml HCl, 10 ml Eisessig und 10 ml Tetrahydrofuran wurde auf - 10° gekühlt und mit 150 mg (2,15 mMol) Natriumnitrit, gelöst in 1 ml Wasser, umgesetzt. Nach 15 Min. bei - 10° hatte sich der größte Teil des Azides abgeschieden. Es wurde mit 50 ml Eiswasser versetzt, in der Kälte abgesaugt, das Azid in 20%iger Kaliumhydrogencarbonatlösung suspendiert, abgesaugt und mit eiskaltem Wasser gründlich gewaschen.

Danach wurde in 60 ml Essigester bei 0° unter Rühren gelöst (Reste nicht gelösten Azides wurden in einigen ml Dimethylformamid in Lösung gebracht). Die Lösung des Azides wurde schließlich mit gesättigter Kochsalzlösung in der Kälte gewaschen und kurz über Natriumsulfat getrocknet.

c) Kondensation

Die Lösungen des Azides und der Aminkomponente wurden vereinigt und einen Tag bei 0° sowie 2 Tage bei Raumtemperatur gehalten.

Das ausgefallene Heptapeptidderivat wurde abgesaugt, mehrfach mit Essigester und mit Methanol gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,25 g = 60% d. Th.

Schmp.: $253\text{-}255^{\circ}$

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25} = -30,0^{\circ}$ (c = 1 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{53}H_{74}N_8O_{11}S$ (1031,3)

ber.: N 10,87
gef.: N 10,72

Eine Probe wurde decarbobenzoxyliert und das Heptapeptid-Hydrobromid dünnschichtchromatographisch untersucht und dabei dessen Einheitlichkeit bestätigt.

Benzyloxycarbonyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucin-hydrazid (X)

1,77 g (1,73 mMol) Z-Val-Cys(Bzl)-Ala-Leu-Phe-Gln-Leu-OMe wurden in 100 ml warmem Dimethylformamid gelöst und bei 70° 10 ml auf 40° erwärmtes Hydrazinhydrat tropfenweise zugegeben. Dabei fiel schon ein großer Anteil des Hydrazids aus.

Die Aufarbeitung erfolgte, nachdem 2 Stdn. bei 70° und 24 Stdn. bei Raumtemperatur umgesetzt worden war, durch Eingießen in 300 ml Wasser. Nach dem Absaugen wurde mehrfach mit Wasser und Methanol gewaschen und getrocknet. Trockene, körnige Masse.

Ausbeute: 1,6 g = 90% d. Th.

Schmp.: 273-276°

Elementaranalyse: $C_{52}H_{74}N_{10}S$ (1031,3)

ber.: N 13,58
gef.: N 13,74

Benzyloxycarbonyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl-S-benzyl-cysteinyl-asparagin (XI)

a) Bereitung der Aminkomponente

1,34 g (1,5 mMol) Z-Glu(OBu^t)-Asn-Phe-Cys(Bzl)-Asn[73] wurden in 25 ml 2 n HBr/Eisessig gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Lösung in 300 ml Äther eingegossen und das ausgefallene Peptid-Hydrobromid gründlich mit Äther gewaschen und über KOH/P_2O_5 getrocknet. Das getrocknete Produkt wurde in 10 ml Dimethylformamid gelöst und zur Freisetzung der Aminkomponente mit 0,6 ml Triäthylamin versetzt.

b) Bereitung des Azides

Die Lösung von 1,2 g (1,8 mMol) Z-Leu-Phe-Gln-Leu-N_2H_3 in einer Mischung aus 16 ml Dimethylformamid, 10 ml Eisessig und 2 ml 2 n HCl wurde auf - 10° abgekühlt und tropfenweise unter Rühren mit 140 mg Natriumnitrit, gelöst in 0,5 ml Wasser, versetzt. Nach 5 Min. wurden nochmals 140 mg Natriumnitrit und 1 ml 2 n HCl zugegeben und nach weiteren 10 Min. in 100 ml Eiswasser eingegossen. Nach dem Absaugen des Azides wurde mit Wasser, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und nochmals mit Wasser gewaschen und das noch feuchte Produkt in 50 ml Dimethylformamid gelöst.

c) Kondensation

Die Lösungen der Aminkomponente und des Azides wurden bei 0° vereinigt und 2 Tage bei 0° aufbewahrt. Danach wurde die Lösung in 1 l Eiswasser eingerührt, mit 1 n HCl auf pH 2-3 eingestellt und noch eine Stunde im Eisschrank stehen gelassen. Das ausgefallene Nonapeptidderivat wurde abzentrifugiert und mit Wasser, zweimal mit Methanol sowie mit Äther gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde noch zweimal mit Essigester ausgekocht und so von Verunreinigungen befreit.

Ausbeute: 800 mg = 40% d. Th.

Schmp.: $244\text{-}246^{\circ}$

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{25} = -34{,}8^{\circ}$ (c = 1 in Ameisensäure)

Elementaranalyse: $C_{66}H_{86}N_{12}O_{17}S$ (1351,58)

ber.: N 12,44 S 2,37
gef.: N 12,28 S 2,47

Das nach Decarbobenzoxylierung erhaltene Peptid-Hydrobromid war papierchromatographisch rein.

$R_f = 0{,}8$ Laufmittel (A)

Aminosäureanalyse:

Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 36 Stdn.)

	Asp	Glu	Leu	Phe	Cys + Cys(Bzl)
theor.:	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00
gef.:	1,70	2,02*	1,97*	2,02*	0,77

* bezogen auf einen Mittelwert von Glu, Leu und Phe.

Benzyloxycarbonyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl-S-benzyl-cysteinyl-asparagin (XII)

a) Bereitung der Aminkomponente

1,17 g (0,9 mMol) Z-Leu-Phe-Gln-Leu-Glu-Asn-Phe-Cys(Bzl)-Asn wurden mit 20 ml 2 n HBr in Eisessig von der Z-Schutzgruppe befreit. Das Salz wurde in 15 ml Dimethylformamid gelöst und hieraus das Amin mit 0,5 ml Triäthylamin freigesetzt.

b) Bereitung des Azides

0,8 g (1,4 mMol) Z-Val-Cys(Bzl)-Ala-N_2H_3 wurden in einem Gemisch aus 10 ml Dimethylformamid, 23 ml Eisessig und 2 ml 2 n HCl gelöst. Nach Abkühlen auf - 10° wurden 110 mg Natriumnitrit, gelöst in 0,5 ml Wasser, tropfenweise unter Rühren zugegeben. Nach 5 Min. wurde nochmals mit 110 mg Natriumnitrit und 1 ml 2 n HCl versetzt und nach weiteren 10 Min. das gebildete Azid durch Eingießen in 100 ml gesättigte Kochsalzlösung bei 0° ausgefällt. Es wurde abgesaugt, mit Wasser, 20%iger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und nochmals mit Wasser gründlich in der Kälte gewaschen.

c) Kondensation

Das in 30 ml Dimethylformamid gelöste Azid wurde bei - 10° mit der Lösung der Aminkomponente vereinigt. Es wurde 2 Tage bei 0° und einen weiteren Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde das Reaktionsgemisch in 500 ml Eiswasser, das 2 ml 2 n HCl enthielt, eingegossen und auf pH 3,0 eingestellt. Das Peptidderivat wurde nach mehrstündigem Stehen abzentrifugiert und gründlich mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt ließ sich durch zweimaliges Auskochen mit Methanol von Verunreinigungen befreien.

Ausbeute: 900 mg = 58% d. Th.

Schmp.: 264-266°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{25} = -35,2^\circ$ (c = 1 in Dimethylformamid)

Elementaranalyse: $C_{84}H_{111}N_{15}O_{20}S_2$ (1715,1)

ber.: N 12,27 S 4,21
gef.: N 12,24 S 3,68

Aminosäureanalyse:

Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 48 Stdn.)

	Asp	Glu	Ala	Val	Leu	Phe	Cys + Cys(Bzl)
theor.:	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
gef.:	2,10	2,06	1,00*	1,06	2,20	2,14	1,87

* bezogen auf Ala

Benzyloxycarbonyl-glycyl-isoleucyl-valyl-glutamyl-γ-tert.-butylester-glutaminyl-S-benzyl-cysteinyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-glycyl-valyl-S-benzyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl-S-benzyl-cysteinyl-asparagin (XIII)

a) Bereitung der Aminkomponente

292 mg (0,17 mMol) des Dodecapeptidderivates XII wurden mit 10 ml 2 n HBr/Eisessig decarbobenzoxyliert. Nach 1 Stde. wurde die Lösung in Äther eingegossen, abzentrifugiert, mehrfach mit Äther gewaschen und über KOH/P_2O_5 getrocknet. Aus dem in der Wärme in 1,6 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid und 0,8 ml Dimethylformamid gelösten Hydrobromid wurde das Amin mit 0,1 ml Triäthylamin freigesetzt.

b) Bereitung des unsymmetrischen Anhydrids

215 mg (0,17 mMol) Nonapeptidderivat I wurden zunächst eine Stde. bei 90° im Vakuum über P_2O_5 getrocknet und

anschließend in 1,8 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid und 0,7 ml Dimethylformamid in der Wärme gelöst. Nach dem Abkühlen auf - 20° wurde mit 0,25 ml einer Lösung aus Triäthylamin und Hexamethylphosphorsäuretriamid (0,5 ml Triäthylamin mit HMP auf ein Endvolumen von 5 ml aufgefüllt) und 0,17 ml einer Lösung aus Chlorameisensäureäthylester und Hexamethylphosphorsäuretriamid (0,5 ml Ester mit HMP auf ein Endvolumen von 5 ml aufgefüllt) versetzt. Es wurde 15 Min. bei - 20° gerührt.

c) Kondensation

Zu der kalten Lösung des Anhydrids wurde bei - 20° die ebenfalls gekühlte Lösung der Aminkomponente gegeben. Das Gemisch wurde noch 3 Stdn. bei - 10° und 24 Stdn. bei 0° aufbewahrt. Die gallertig gewordene Masse wurde in 200 ml gesättigte Kochsalzlösung eingerührt und noch eine Stde. im Eisschrank stehen gelassen. Danach wurde abgesaugt und mit viel Wasser, Methanol und zuletzt mit Äther gewaschen und über KOH/P_2O_5 getrocknet. Das getrocknete Produkt wurde mit wenig Methanol ausgekocht.

Ausbeute: 440 mg = 92% d. Th.

Schmp.: über 300° (Zers.)

Elementaranalyse: $C_{136}H_{187}N_{25}O_{32}S_4$ (2812,4)

ber.: N 12,70 S 4,65
gef.: N 12,43 S 4,44

Aminosäureanalyse:

Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 72 Stdn.)

	Asp	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Cys + Cys(Bzl)
theor.:	2,00	4,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	4,00
gef.:	1,94	3,85*2,10*2,09		1,90	1,01	2,01*2,04*			4,61

* bezogen auf den Mittelwert von Glu, Gly, Leu und Phe

Acidolyse des Glutaminsäure-γ-tert.-butylesters (XIV)

440 mg des trockenen Heneikosipeptidderivates XIII wurden in 6 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach einer Stde. wurde die Trifluoressigsäure im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit 20 ml Benzol versetzt, dieses ebenfalls abdestilliert und der Rückstand mit 30 ml Äther verrieben. Es wurde abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 430 mg = 100%

Oxydiertes Glycyl-isoleucyl-valyl-glutamyl-glutaminyl-cysteinyl-cysteinyl-alanyl-glycyl-valyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl-cysteinyl-asparagin (XV)

100 mg teilgeschützte, synthetische A-Kette XIV wurden 2 Stdn. bei 70° im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Das getrocknete Pulver wurde in 100 ml frisch über Natrium destilliertem flüssigem Ammoniak gelöst und in einer Spezialapparatur mit in flüssigem Ammoniak gelöstem Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung behandelt. Die Blaufärbung wurde ca. 1 Min. aufrechterhalten und dann durch Zugabe von wenig Ammoniumchlorid entfärbt. Die Hauptmenge des Lösungsmittels wurde bei Normaldruck unter Rühren, der Rest durch Evakuieren des Gefäßes entfernt. Das zurückgebliebene Pulver wurde mit 20 ml 1 n Essigsäure aufgenommen, auf pH 9,0 eingestellt und 5 Stdn. bei Raumtemperatur gegen destilliertes Wasser im Visking-Schlauch 20/32 dialysiert. Das Dialysat wurde gefriergetrocknet.

Tetra-S-sulfonat (Buntesalz) der variierten Insulin-A-Kette (XVI)

Der Rückstand der Reduktionsbehandlung wurde in wenig destilliertem Wasser suspendiert und durch Einstellen auf pH 9,2 in Lösung gebracht. Anschließend wurden 10 ml Tris-Puffer pH 9,2, 250 mg Natriumsulfit und 200 mg Natriumtetrathionat

zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stdn. bei 37° wurde lyophilisiert. Durch Gelfiltration über Sephadex G-25 in 0,02 M Ammoniumhydrogencarbonat konnte das Rohprodukt weiter gereinigt und entsalzt werden (Abb. 4).

Ausbeute: 36 mg = 40% d. Th. (bezogen auf XIV)
Davon enthielt der Haupt-Peak (Tetra-S-sulfonat-A-Kette):
24 mg = 27% d. Th.

Kombination der /Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}/-Tetra-S-sulfonat-A-Kette mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette zum entsprechenden Hybridinsulin (XVII)

Die zunächst erfolgte Reduktion des Buntesalzes und die nachfolgende Extraktion des Mercaptoäthanols wurden in einer kleinen Kutscher-Streudel-Apparatur vorgenommen, die mit einem Gaseinleitungsrohr versehen war.

10 mg des Buntesalzes wurden in 2 ml bidest. Wasser gelöst und auf pH 5 eingestellt. Dann wurden unter Eiskühlung 0,5 ml 1 M Mercaptoäthanollösung in Wasser (46-facher Überschuß) zugegeben und 5 Min. lang Stickstoff durchgeleitet. Anschließend wurde 6 Min. lang im kochenden Wasserbad erhitzt, wobei weiterhin ein schwacher Stickstoffstrom durch die Lösung geleitet wurde. Diese wurde abgekühlt, mit dest. Essigester überschichtet und unter Eiskühlung das Mercaptoäthanol extrahiert. In der Destillationsblase der Apparatur befanden sich ca. 300 ml Essigester und 9 g Bleiacetat. Nach 3 Stdn. wurde der überstehende Essigester mit einer Kapillare abgesaugt und anschließend solange zunächst durch und später über die gallertig gewordene Masse Stickstoff geleitet, bis der Essigester verflüchtigt war.

Das Reduktionsgemisch wurde in ein kleines Gläschen auf 2,5 mg Bis-S-sulfonat gegeben, das Gefäß mit 1-2 ml bidest. Wasser nachgespült und der pH mit 0,1 n Natronlauge unter Eiskühlung auf pH 10,6 eingestellt. Dabei gingen die

reduzierte A-Kette und die B-Kette in Lösung. Schließlich wurde mit 0,1 M Glycinpuffer pH 10,6 auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt und die Lösung dann bei 2^{o} für ca. 16 Stdn. unter Zutritt von Luft gerührt.

Die Kombinationslösung wurde mit 2 n HCl auf pH 7,5 eingestellt und mit 1,8%iger Natriumchloridlösung auf 10 ml aufgefüllt. Die Aktivität des Kombinates wurde danach direkt in der erhaltenen Lösung bestimmt und auf die eingesetzte Menge B-Kette bezogen.

Aktivitätsbestimmung

Die Messung der Insulinaktivität des Kombinates erfolgte im Mäusefalltest und im Fettkörpertest am Nebenhodenfettgewebe der Ratte.

Die Aktivität des erhaltenen Insulins betrug im Mäusefalltest 0,8 und 1,2%.

Im Fettkörpertest wurde eine Aktivität von 1,0% erhalten.

Bei Kombinationsversuchen der natürlichen A-Kette mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette wurde nach demselben Verfahren gearbeitet. Die dabei erhaltenen biologischen Aktivitäten entsprachen einem Insulingehalt von durchschnittlich 20%.

3.5 Darstellung des MERRIFIELD-Harzes, dessen Chlormethylierung und Anesterung von Boc-Aminosäurederivaten

Copolymerisation von Styrol und Divinylbenzol in Suspension

In einem 2 l Dreihalskolben wurden 15 g Glutofix (Kalle) in 1 l Wasser gelöst. Dazu wurde unter starkem Rühren eine Lösung, bestehend aus 160 ml dest. Styrol, 3,2 ml Divinylbenzol (55%) und 1,1 g Benzoylperoxyd in einem Schuß zugegeben. Nachdem noch 24 Stdn. bei 80° weitergerührt worden war, wurde das Glutofix mit 2 n Schwefelsäure hydrolysiert, die Polymerpartikel (50 - 250 µ Ø) abgesaugt und mit Wasser, 1 n Natronlauge, 1 n HCl, Wasser, Dimethylformamid und Methanol gewaschen. Schließlich wurde zunächst an der Luft und dann im Vakuum bei 100° getrocknet.

Chlormethyl-Polystyrol-Divinylbenzol Copolymer (Merrifield-Harz)[77]

147 g durch Siebfraktionierung abgetrennte Copolymerpartikel mit einem Durchmesser von 0,1 - 0,3 mm wurden in 590 ml Methoxychlormethan 2 Stdn. gerührt. Der dicke Brei wurde auf 0° abgekühlt und dazu im Laufe von 30 Min. eine Lösung von 20 ml Zinntetrachlorid in 300 ml Methoxychlormethan unter starkem Rühren zugetropft. Es wurde noch 2 Stdn. im Eisbad weitergerührt, die Suspension mit 1 l Dioxan verdünnt, abgesaugt und wie folgt gewaschen: 2 l Dioxan/3 n HCl 3:1, 2 l Dioxan/Wasser 3:1, Dioxan/konz. HCl 3:1, Dioxan/Wasser, Dioxan/Methanol jeweils 1:1, Methanol, Methanol/Wasser, Wasser und schließlich Methanol. Getrocknet wurde über Natronlauge/konz. Schwefelsäure und Natronlauge/P_2O_5 im Vakuum.

Cl-Analyse: Das Harz enthielt 7,63% Cl = 2,1 mMol Cl/g Harz.

Anesterung von tert.-Butyloxycarbonyl-asparagin an das Merrifield-Harz[30]

1,02 g (4,4 mMol) Boc-Asn wurden in 7,5 ml Essigester und 2,5 ml Äthanol gelöst. Diese Lösung wurde mit 2 g Merrifield-Harz (7,6% Cl = 2,1 mMol Cl/g) und 0,5 ml Triäthylamin (4 mMol) versetzt. Das Gemisch wurde unter Rühren 48 Stdn. im Glycerinbad bei 70° erhitzt. Danach wurde das Harz abfiltriert, dreimal mit heißem Essigester, dreimal mit heißem Äthanol, dreimal mit kaltem Äthanol, dreimal mit Äthanol/Wasser 1:1, dreimal mit Methanol/Wasser 1:1, dreimal mit Wasser, dreimal mit Methanol und dreimal mit Äther gewaschen. Schließlich wurde über P_2O_5 im Vakuum getrocknet.

Zur Bestimmung der Anesterungsausbeute von Boc-Asn an das Copolymer wurden 100 mg des Produktes in 6 ml Trifluoressigsäure suspendiert und durch diese Suspension 1 1/2 Stdn. lang Bromwasserstoff geleitet. Vom Träger wurde abfiltriert, dieser sechsmal mit Trifluoressigsäure gewaschen, die vereinigten Filtrate im Vakuum eingedampft, der Rückstand erneut in 5 ml Trifluoressigsäure aufgenommen und erneut im Vakuum zur Trockene eingeengt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal mit Essigsäure wiederholt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und in einem Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt.

Die Aminosäureanalyse ergab daraus 0,5 mMol Boc-Asn/g Harz.

Anesterung von tert.-Butyloxycarbonyl-alanin an käufliches Chloromethyl-Polystyrol-Divinylbenzol Copolymer (2% Cl-Gehalt)

4 g käufliches chloriertes Harz (0,57 mMol Cl/g = 2% Cl) wurden in 60 ml Äthanol/Essigester 1:1 mit 0,5 g Boc-Ala und 0,335 ml Triäthylamin 40 Stdn. auf 80° erhitzt. Danach wurde abfiltriert, viermal mit je 20 ml Äthanol/Essigester 1:1, viermal mit je 20 ml Äthanol/Essigester 3:1 und zuletzt mit viermal 20 ml Methanol gewaschen und getrocknet.

Zur Analyse wurden 100 mg des Boc-Ala-Harzes in 5 ml Eisessig und 5 ml HCl konz. 18 Stdn. bei 120° hydrolysiert, anschließend abfiltriert, mit Eisessig und Wasser gewaschen

und eingeengt. Der Rückstand wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Die Aminosäureanalyse ergab 0,25 mMol Boc-Ala/g Harz.

3.6 Darstellung der Boc-Aminosäurederivate

tert.-Butyloxycarbonylazid[96] (XVIII)

Eine Lösung von 100 g Boc-N_2H_3 in 88 g Eisessig und 125 ml Wasser wurden in einem Eis/Kochsalzbad gekühlt und unter heftigem Rühren eine Lösung von 57,4 g Natriumnitrit in 80 ml Wasser innerhalb von 50-60 Min. zutropfen gelassen. Dabei war darauf zu achten, daß die Temperatur nicht 5^{0} überstieg. Es wurde noch für weitere 30 Min. im Eisbad belassen und dann 125 ml Wasser zugegeben, die goldgelbe Azidphase abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 40 ml Äther extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 50 ml Wasser und dreimal mit je 50 ml 1 n Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wurde der Äther im Wasserbad (20^{o}) unter Anlegen eines leichten Vakuums abgezogen.

Ausbeute: 89-94 g = 82-87% d. Th.

Die zunächst noch leicht gelbliche Flüssigkeit wurde nach Vakuumdestillation farblos.

Sp.: $74-76^{o}$

tert.-Butyloxycarbonyl-alanin[97] (XIX)

600 mMol (53,4 g) L-Ala wurden in einem Gemisch aus 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 660 mMol (93 g) Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 10,1 mit 4 n Natronlauge titriert. Nach ca. 10 Stdn. war die Reaktion beendet.

Zur Aufarbeitung wurde zunächst das Dioxan im Vakuum abdestilliert, dann die Lösung zweimal mit wenig Dichlormethan ausgeschüttelt und mit fester Citronensäure angesäuert (pH 3). Der dabei ausgefallene dicke Brei wurde mit

Wasser verdünnt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde aus Äther/Petroläther rekristallisiert.

Ausbeute: 1o5 g = 80% d. Th.
Schmp.: 80-82°
Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25}$ = - 26,1° (c = 1 in Eisessig)

tert.-Butyloxycarbonyl-asparagin[98,99] (XX)

13,2 g (0,1 Mol) L-Asparagin wurden in einem Gemisch aus 40 ml Wasser und 40 ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 15 g Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 9,5 mit 4 n Natronlauge titriert. Nach ca. 2 Tagen war die Reaktion beendet. Zur Aufarbeitung wurde zunächst das Dioxan im Vakuum abgezogen, der Rückstand zweimal kurz mit Äther extrahiert und die wässrige Phase bei 0° mit fester Citronensäure angesäuert (pH 3). Das dabei ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und aus Alkohol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 15,1 g = 65% d. Th.
Schmp.: 173-175°
Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25}$ = - 8,3° (c = 1 in Dimethylformamid)

tert.-Butyloxycarbonyl-asparagin-p-nitrophenylester[98] (XXI)

4,6 g (20 mMol) Boc-Asn wurden in einem Gemisch aus 50 ml Tetrahydrofuran und 15 ml Dimethylformamid gelöst und mit 3,1 g (22mMol) p-Nitrophenol sowie 4,5 g (22 mMol) DCCI versetzt und 6 Stdn. bei 0° stehen gelassen. Der Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, das Filtrat im Vakuum eingeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit verdünnter Natriumbicarbonat-Lösung, 10%iger Citronensäurelösung und Wasser ausgeschüttelt. Der Essigester wurde

abdestilliert und der Rückstand zweimal aus Äthanol/ Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 3,7 g = 52% d. Th.

Schmp.: 148-149°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_D^{25}$ = - 45,3° (c = 1 in Dimethylformamid)

Cystein-tosylat[54] (XXII)

Zu einer Suspension von 24 g (0,1 Mol) L-Cystin in 50 ml konz. HCl und 40 ml Wasser wurden 8 g Zinkstaub in kleinen Portionen innerhalb 10 Min. unter starkem Rühren und unter Kühlung (5-8°) gegeben. Nach weiteren 5 Min. wurde abgesaugt und das Filtrat zu einer Lösung von 44 g p-Toluolsulfonsäure·H_2O in 20 ml Wasser gegeben. Dabei kristallisierte das Cystein-tosylat sofort aus. Noch einige Stdn. wurde bei 0° gehalten, dann abgesaugt, mit wenig 10%iger p-Toluolsulfonsäurelösung bei 0° gewaschen und aus 5%iger p-Toluolsulfonsäurelösung rekristallisiert.

Ausbeute: 49 g = 82% d. Th.

Schmp.: 222-224°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_D^{25}$ = + 39° (c = 10 in Dimethylformamid)

$C_{10}H_{15}NO_5S_2$ (293)

S-Diphenylmethyl-cystein[54,100] (XXIII)

Eine Lösung von 29,3 g (0,1 Mol) Cys(Tos) und 20,5 g (0,1 Mol) Diphenylmethylchlorid in 30 ml Dimethylformamid wurden 2 Stdn. bei 80-90° unter Durchleiten von Stickstoff erhitzt. Diese Lösung wurde danach in 2 l einer gesättigten

Natriumacetatlösung unter Rühren eingegossen, der Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser und Aceton gewaschen. Das noch feuchte Produkt wurde 10 Min. mit Aceton ausgekocht.

Ausbeute: 15 g = 53% d. Th.

Schmp.: 202-203°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{25}$ = + 15,6° (c = 3 in Äthanol/5 n HCl 15/1)

Elementaranalyse: $C_{16}H_{17}NO_2S$ (287,4)

ber.: N 4,87
gef.: N 4,85

tert.-Butyloxycarbonyl-S-diphenylmethyl-cystein Dicyclohexyl-ammoniumsalz (XXIV)

5,9 g (20 mMol) Cys(Dpm) wurden in 20 ml Dioxan und 20 ml Wasser suspendiert, mit 4 g Boc-N_3 versetzt und mit 4 n Natronlauge im Autotitrator bei pH 9,8 titriert. Die Reaktion war nach ungefähr 12 Stdn. beendet, da bis dahin die berechnete Menge Natronlauge von 10 ml verbraucht und die Lösung klar war.

Es wurde nun mit 20 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 20 ml Äther extrahiert. Beim sich anschließenden Ansäuern (0°) mit fester Citronensäure schieden sich neben einem öligen Produkt auch noch gallertige Bestandteile ab [nicht umgesetztes Cys(Dpm)]. Es wurde in einen Scheidetrichter überführt und die Suspension zweimal mit Essigester extrahiert, wobei die geringen Mengen an gallertigen Bestandteilen in der organischen Phase suspendiert blieben. Nach dem Filtrieren und Trocknen erwiesen sich diese als nicht umgesetztes Cys(Dpm). Die Essigesterphase wurde anschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels blieb ein leicht gelblich gefärbtes Öl zurück, welches nicht kristallisiert werden konnte.

Es wurde deshalb in 25 ml Äther gelöst und durch tropfenweise Zugabe von 4 ml Dicyclohexylamin in das entsprechende DCHA-Salz überführt. Die sich sofort abscheidenden Kristalle wurden nach einer Stunde abgesaugt und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 8 g = 66% d. Th.

Schmp.: 157-158°
nach Rekristallisation aus Chloroform/Äther
158-159°

Elementaranalyse: $C_{33}H_{48}N_2O_4S$ (568,8)

ber.: N 4,92
gef.: N 5,15

tert.-Butyloxycarbonyl-S-diphenylmethyl-cystein (XXV)

Boc-Cys(Dpm)-DCHA-Salz wurde in Essigester gelöst und durch Schütteln mit verdünnter wässriger Citronensäurelösung das freie Aminosäurederivat gewonnen. Nach Waschen, Trocknen und Abziehen des Essigesters blieb ein farbloses Öl zurück, das aus wenig Dichlormethan unter Zusatz von Petroläther in feinen Nadeln kristallisierte. Nach längerem Stehen bei 0° konnte eine Kristallisation in Form großer Nadeln auch aus Dichlormethan allein erreicht werden.

Schmp.: 100-101°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25} = -23,5^\circ$ (c = 1 in Essigsäure)

Elementaranalyse: $C_{21}H_{25}NO_4S$ (387,5)

ber.: N 3,64 S 8,27
gef.: N 3,69 S 8,28

S-Trityl-cystein[54] (XXVI)

Zu einer Lösung von 29,3 g (0,1 Mol) Cys(Tos) in 60 ml Dimethylformamid wurden 42 g (0,15 Mol) Tritylchlorid gegeben und 2 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde durch Einrühren in 500 ml einer 10%igen Natriumacetatlösung das Cys(Tri) zusammen mit Triphenylcarbinol ausgefällt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Die Reinigung des Produktes erfolgte durch Auskochen in 400 ml Aceton (30 Min. am Rückfluß). Nach dem Abkühlen kristallisierte das Cys(Tri) aus. Es wurde mit Wasser, Aceton und Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 28 g = 75% d. Th.

Schmp.: 179-181°

tert.-Butyloxycarbonyl-glutamin[101] (XXVII)

14,4 g (0,1 Mol) L-Glutamin wurden in einem Gemisch aus 40 ml Wasser und 40 ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 15 g Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 10,3 mit 4 n Natronlauge titriert. Nach ca. 24 Stdn. war die Reaktion beendet. Das Dioxan wurde abdestilliert, zweimal mit Äther extrahiert und mit fester Citronensäure bei 0° auf pH 3 angesäuert. Das ausgefallene Boc-Derivat wurde abgesaugt und aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 9,5 g = 62% d. Th.

Schmp.: 116-118°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_{578}^{22} = -2,7°$ (c = 1 in Äthanol)

$C_{10}H_{18}N_2O_5$ (246,3)

tert.-Butyloxycarbonyl-glutamin-p-nitrophenylester[102] (XXVIII)

Eine Lösung von 19,8 g (80 mMol) Boc-Gln und 12,5 g (90 mMol) p-Nitrophenol in 50 ml Tetrahydrofuran wurden bei - 10° mit 16,4 g (80 mMol) DCCI versetzt und 24 Stdn. bei 0° sowie 48 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die breiige Masse wurde mit 30 ml Tetrahydrofuran aufgeschlämmt, der Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und mit Tetrahydrofuran gründlich gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels verblieb ein fester Rückstand, der aus Äthanol rekristallisiert wurde. Da das erhaltene Produkt gallertig war und noch p-Nitrophenol enthielt, wurde nochmals aus Äthanol und anschließend aus Äthanol/wenig Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 12 g = 40% d. Th.

Schmp.: 144-146°

Nach noch zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol:

Ausbeute: 8,8 g = 30% d. Th.

Schmp.: 149-150°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{25}$ = - 31,8° (c = 1 in Essigester)

$C_{16}H_{21}N_3O_7$ (367,4)

Glutaminsäure-γ-p-nitrobenzylester (XXIX)

Zu 50 ml Äther wurden unter Eiskühlung und Rühren 5 ml konz. Schwefelsäure langsam zugetropft und danach abgewartet, bis die Temperatur wieder auf 0° abgesunken war. Dann wurden 10,7 g (70 mMol) p-Nitrobenzylalkohol portionsweise zugesetzt. Damit dieser vollständig in Lösung ging, mußten noch weitere 30 ml Äther zugegeben werden. Schließlich wurde der Äther abgezogen und zu der öligen, gelbbraunen Flüssigkeit 7,4 g (50 mMol) L-Glu in kleinen Portionen zugesetzt. Die anfangs breiige Masse wurde 20 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt, auf 0° abgekühlt und 100 ml Äthanol portionsweise zugegeben.

Da sich die glasig hart gewordene Masse in der Kälte im Alkohol nicht löste, wurde zum Sieden erhitzt. Beim Abkühlen fiel ein öliges Produkt aus, das in der Kälte zu einer klebrigen, fadenziehenden Masse wurde, die jedoch nach Zugabe von 20 ml Wasser durchkristallisierte. Nach einigem Stehen wurde abgesaugt und zweimal aus viel heißem Wasser rekristallisiert.

Es wurde ein pulvriges, leicht grünlich-gelbliches Produkt erhalten.

Ausbeute: 4,2 g = 30% d. Th.

Schmp.: 167-168°

Elementaranalyse: $C_{11}H_{12}N_2O_6$ (228,25)

ber.: N 9,93
gef.: N 9,93

tert.-Butyloxycarbonyl-glutaminsäure-γ-benzylester (XXX)

47,44 g (200 mMol) Glu-γ-OBzl[84] wurden in einem Gemisch aus 80 ml Dioxan und 80 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde mit 32 g Boc-N_3 versetzt und im Autotitrator bei pH 9 mit 4 n Natronlauge titriert.

Nach 24 Stdn. wurde die klare Lösung im Vakuum eingeengt und der Rückstand mit 200 ml Wasser versetzt. Es wurde kurz mit 20 ml Äther ausgeschüttelt und das Reaktionsprodukt durch Ansäuern mit fester Citronensäure bei 0° (pH 2,5-3) ausgefällt. Das ölige Produkt wurde mit Essigester ausgeschüttelt, die Essigesterphase mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Es wurde ein gelblich gefärbtes Öl erhalten.

Ausbeute: 60 g = 90% d. Th.

Zwecks Reinigung des öligen Produktes wurde in Äther aufgenommen und die Lösung mit 35 ml Dicyclohexylamin versetzt. Das bald kristallisierende Salz wurde nach einer Stunde abgesaugt und mit Äther gewaschen.

Rekristallisation aus Aceton/Äthanol. Weiße Nadeln.

Ausbeute: 76,3 g = 82% d. Th. (bezogen auf Ausbeute an Boc-Glu-γ-OBzl)

Schmp.: 135-136°

Elementaranalyse: $C_{29}H_{46}N_2O_6$ (518,7)

ber.: N 5,40
gef.: N 5,50

tert.-Butyloxycarbonyl-isoleucin[97] (XXXI)

6,65 g (50 mMol) L-Isoleucin wurden in 10 ml Dioxan und 10 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von 7,8 g (55 mMol) Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 9,8 mit 4 n Natronlauge titriert. Die Reaktion war nach etwa 8 Stdn. beendet.

Das Dioxan wurde im Vakuum abdestilliert und die zurückbleibende wässrige Phase mit fester Citronensäure angesäuert und zweimal mit je 50 ml Äther und je 25 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden gründlich mit Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum eingeengt, wobei ein sirupöser Rückstand hinterblieb. Dieser konnte aus Aceton/Wasser als Hemihydrat kristallisiert werden.

Ausbeute: 10,5 g = 91% d. Th.

Schmp.: 58-60°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25}$ = + 2,4° (c = 1 in Eisessig)

Elementaranalyse: $C_{11}H_{21}NO_4$ (231,3) · 1/2 H_2O

ber.: N 5,83
gef.: N 5,96

tert.-Butyloxycarbonyl-leucin[97,103] (XXXII)

78,6 g (0,6 Mol) L-Leucin wurden in einem Gemisch aus 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 93 g (0,66 Mol) Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 10,3 mit 4 n Natronlauge titriert. Nach 20 Stdn. war die Reaktion beendet. Darauf wurde vom Dioxan abgezogen, zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die wässrige Phase mit fester Citronensäure angesäuert. Der ausgefallene dicke Brei wurde mit 1 l Wasser verdünnt und auf pH 3 eingestellt. Es wurde abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen.

Rekristallisation aus Tetrahydrofuran/Petroläther.

Ausbeute: 110 g = 84% d. Th.

Schmp.: 79-81°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25}$ = - 26,8° (c = 1 in Eisessig)

$C_{11}H_{21}O_4N$ (211,3) · 1/2 H_2O

tert.-Butyloxycarbonyl-phenylalanin[97,104] (XXXIII)

16,5 g (0,1 Mol) L-Phenylalanin wurden in 30 ml Wasser und 30 ml Dioxan suspendiert, mit 20 g Boc-N_3 versetzt und bei pH 10,1 im Autotitrator mit 4 n Natronlauge titriert. Nach Beendigung der Reaktion, ca. 15 Stdn., wurde mit 100 ml Wasser versetzt, zweimal mit je 50 ml Äther extrahiert und mit fester Citronensäure auf pH 2-3 angesäuert. Das ausgefallene Öl wurde mit dreimal 100 ml Essigester extrahiert, die vereinten Essigesterextrakte mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt.

Rekristallisation aus Äther/Petroläther.

Ausbeute: 20,5 g = 77% d. Th.

Schmp.: 87-89°

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{25}$ = - 4,4° (c = 1 in Eisessig)

Elementaranalyse: $C_{14}H_{19}NO_4$ (267,3)

ber.: N 5,29
gef.: N 5,33

tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-tyrosin[104] (XXXIV)

27,1 g Tyr(Bzl)[105] (0,1 Mol) wurden in 40 ml Dioxan und 40 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von 15,6 g (0,11 Mol) Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 9,8 mit 4 n Natronlauge titriert. Nach einem Tag war die Reaktion beendet. Das Dioxan wurde im Vakuum bei 40° verdampft, der Rückstand mit Wasser und Essigester ausgezogen, die wässrige Lösung bei 0° mit fester Citronensäure angesäuert und mit Essigester extrahiert. Nach dem Waschen und Trocknen wurde der Essigester im Vakuum verdampft.

Das erhaltene Öl kristallisierte aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 30,3 g = 82% d. Th.

Schmp.: 105-106,5° (Zers.)

Spezifische Drehung:
$[\alpha]_{578}^{23}$ = + 13,0° (c = 1 in Aceton)

Elementaranalyse: $C_{21}H_{25}O_5N$ (371,42)

ber.: N 3,79
gef.: N 3,91

tert.-Butyloxycarbonyl-valin[97] (XXXV)

11,6 g (0,1 Mol) L-Valin wurden in einem Gemisch aus 40 ml Wasser und 40 ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 15,6 g (0,11 Mol) Boc-N_3 unter Rühren im Autotitrator bei pH 9,5 mit 4 n Natronlauge titriert. Die Reaktion war nach 10 Stdn. beendet.

Nach Abziehen des Dioxan im Vakuum wurde zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die wässrige Lösung mit fester Citronensäure angesäuert (pH 3). Das ausgefallene

Öl wurde mit Essigester extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt.

Das zurückbleibende Öl kristallisierte aus Petroläther.

Ausbeute: 14,9 g = 69% d. Th.

Schmp.: 76-77°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_{578}^{24} = -5{,}77^{\circ}$ (c = 1 in Eisessig)

Elementaranalyse: $C_{10}H_{19}NO_4$ (217,3)

ber.: N 6,45
gef.: N 6,45

3.7 Synthese des S-diphenylmethylierten Pentapeptids Glu-Asn-Phe-Cys(Dpm)-Ala

t-Butyloxycarbonyl-glutamyl-γ-benzylester-asparaginyl-phenylalanyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-alanyl-Polymer (XXXVI)

Zur Synthese dieses geschützten Pentapeptides wurden 2 g Boc-Ala-Polymer mit einer Beladung von 0,25 mMol Boc-Ala/g Harz in einem Spezialreaktionsgefäß folgenden Operationen unterworfen:

1. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte durch 15 ml 1 n HCl in Eisessig (30-facher molarer Überschuß) in 30 Min. Anschließend wurde mit dreimal je 20 ml Eisessig, Äthanol und Dimethylformamid jeweils 10 Min. ausgewaschen.

2. Die Aminogruppe wurde mit 15 ml einer 10%igen Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid (30facher molarer Überschuß) freigesetzt. Die Behandlungsdauer war 15 Min. Danach wurde mit dreimal je 20 ml Dimethylformamid und Dichlormethan jeweils 10 Min. gewaschen.

3. Die anschließend zur Peptidsynthese eingesetzten Boc-Aminosäuren (Boc-Cys(Dpm), Boc-Phe und Boc-Glu(OBzl)) wurden in 4-fachem Überschuß (2 mMol, gelöst in 5 ml

Dichlormethan) zugesetzt. Nach einer Einwirkungsdauer von 10 Min. wurde dazu die äquimolare Menge einer 1 m Lösung aus DCCI in Dichlormethan gegeben.

Nach einer Reaktionsdauer von 3 Stdn. wurde mit dreimal je 20 ml Dichlormethan und Äthanol nachgewaschen. Die Reaktionen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt.

Asparagin wurde als aktivierter Ester, Boc-Asn-ONP, zur Synthese eingesetzt. Hierbei wurde nach der Freisetzung der Aminogruppe durch Triäthylamin nur mit Dimethylformamid gewaschen und anschließend der Ester in 4-fachem Überschuß (2 mMol, gelöst in 5 ml Dimethylformamid) zugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 48 Stdn. bei Raumtemperatur wurde mit Dimethylformamid und Äthanol nachgewaschen.

Glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl-diphenylmethyl-cysteinyl-alanin Hydrobromid (XXXVII)

Zur Abspaltung des Peptids vom Träger wurde das Harz in der für die Synthese des Peptids benutzten Apparatur in 30 ml Trifluoressigsäure suspendiert und durch die Fritte 90 Min. lang Bromwasserstoff geperlt. Danach wurde das Harz abfiltriert und noch dreimal mit je 10 ml Trifluoressigsäure und 10 ml Trifluoressigsäure/Dichlormethan 1:1 nachextrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden eingeengt und der Rückstand mit Äther verrieben. Das sofort fest gewordene, zunächst ölige Produkt wurde abgesaugt, mehrfach mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 300 mg = 85% d. Th.
(Da bei der Abspaltung des Peptids vom Harz gleichzeitig eine teilweise Abspaltung des Diphenylmethylrestes erfolgt (35-40%), ergibt sich die angegebene prozentuale theoretische Ausbeute unter Zugrundelegung eines mittleren Molekulargewichtes von ca. 775 für das vorliegende Peptidhydrobromid-Gemisch.)

Aminosäureanalyse:

Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 24 Stdn.)

	Ala	Phe	Asp	Glu
theor.:	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.:	1,00*	0,97	0,95	0,95

* bezogen auf Alanin, Cystein und Cys(Dpm) wurden nicht bestimmt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten, daß neben dem Hauptprodukt Glu-Asn-Phe-Cys(Dpm)-Ala vor allem das ungeschützte Peptid Glu-Asn-Phe-Cys-Ala neben geringen Mengen des entsprechenden Disulfides und Spuren zweier weiterer Komponenten vorlagen (Abb. 6).

Glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl-diphenylmethyl-cysteinyl-alanin (XXXVIII)

100 mg des Rohproduktes wurden in 5 ml dest. Wasser gelöst und durch Zugabe einer Lösung von Triäthylamin in Äthanol der pH auf 4 eingestellt. Unter diesen Bedingungen fiel das SH-geschützte Pentapeptid mit freier Aminkomponente aus, während alle anderen Peptide in Lösung blieben.

Die ausgefallene gallertige Masse wurde abgesaugt, mit Wasser und Äthanol gewaschen und getrocknet. Zur weiteren Reinigung wurde aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt.

Ausbeute: 40 mg

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse in 6 n HCL (110°, 24 Stdn.)

	Ala	Cys-SO_3^-	Phe	Asp	Glu
theor.:	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.:	1,02	1,03	1,07	0,94	0,97

bezogen auf den Mittelwert aller Aminosäuren.

Vor Beginn der Hydrolyse wurde der Diphenylmethylrest des Peptids mittels siedender Trifluoressigsäure in Gegenwart von Phenol abgespalten und das ungeschützte Produkt der Perameisensäureoxydation unterworfen.

Das Produkt war dünnschichtchromatographisch rein.

R_{Leu} = 0,9 Laufmittel (A)

R_{Leu} = 0,97 Laufmittel (B)

3.8 Darstellung des Peptids Bis-(Glu-Asn-Phe)-Cys_2-bis-Ala

Bis-(glutamyl-asparaginyl-phenylalanyl)-cystinyl-bis-alanin (XXXIX)

200 mg des Rohproduktes (XXXVII) wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach Zugabe von 50 mg Phenol wurde 20 Min. lang unter Feuchtigkeitsausschluß am Rückfluß gekocht. Die Temperatur des Heizbades betrug dabei 80°. Im Anschluß daran wurde die Trifluoressigsäure im Vakuum bei Raumtemperatur abdestilliert, der Rückstand mit Äther verrieben, das feste Produkt abgesaugt und mehrfach mit Äther nachgewaschen.

Das trockene Peptid wurde in 10 ml verdünnter Natronlauge pH 9 gelöst. Durch diese Lösung wurde solange Sauerstoff geperlt, bis keine SH-Gruppen mehr nachzuweisen waren (Rotfärbung bei Zugabe einer ammoniakalischen Lösung von Nitroprussidnatrium bei Gegenwart von freien SH-Gruppen). Die Oxydationsdauer betrug ca. 24 Stdn. Durch Gelfiltration über Sephadex G-15 in 0,1 n Ammoniumhydrogencarbonat wurde das Rohprodukt gereinigt (Abb. 7) und durch Gefriertrocknung isoliert.

Ausbeute: 106 mg = 70% d. Th.

Schmp.: 250-253°

Spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{24}$ = - 76° (c = 0,5 in 0,1 n Ammoniumhydrogencarbonat)

Elementaranalyse: $C_{24}H_{33}O_9N_6S_2$ (1163,3)

ber.: N 14,45 S 5,51

gef.: N 14,78 S 5,86

Aminosäureanalyse:

Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 24 Stdn.)

	$Cys\text{-}SO_3^-$	Asp	Glu	Ala	Phe
theor.:	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.:	1,01	0,95	1,00*	1,01	1,04

* bezogen auf Glu

Vor Beginn der Hydrolyse wurde das Peptid der Perameisensäureoxydation unterworfen.

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung erwies sich das Peptid als rein.

R_{Leu} = 0,3 Laufmittel (A)

R_{Leu} = 0,56 Laufmittel (B)

3.9 Synthese der /Āla[12]/-A-Kette des Schafinsulins

tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-isoleucyl-valyl-glutamyl- -benzylester-glutaminyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-alanyl-glycyl-valyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-O-benzyl-tyrosyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl- -benzylester-asparaginyl-O-benzyl-tyrosyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-asparaginyl-POLYMER (XL)

Zur Synthese dieser geschützten /Āla[12]/-A-Kette des Schafinsulins wurde 1 g Boc-Asn-Polymer mit einer Beladung von 0,5 mMol Boc-Asn/g Harz in einem Spezialreaktionsgefäß folgenden Operationen unterworfen:

1. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte durch 15 ml 1 n HCl in Eisessig in 30 Min. Anschließend wurde mit dreimal je 20 ml Eisessig, Äthanol und Dimethylformamid jeweils 10 Min. gewaschen.

2. Die Aminogruppe wurde mit 15 ml einer 10%igen Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid freigesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 15 Min. Anschließend wurde mit dreimal je 20 ml Dimethylformamid und Dichlormethan jeweils 10 Min. gewaschen.

3. Die anschließend zur Peptidsynthese eingesetzten Boc-Aminosäurederivate (Boc-Cys(Dpm), Boc-Tyr(Bzl), Boc-Glu (OBzl), Boc-Leu, Boc-Ala,Boc-Val, Boc-Gly und Boc-Ile) wurden in 4-fachem Überschuß (2 mMol, gelöst in 5 ml Dichlormethan) zugesetzt. Nach einer Einwirkungsdauer von 10 Min. wurde dazu die äquimolare Menge einer 1 M Lösung aus DCCI in Dichlormethan gegeben.

   Nach einer Reaktionsdauer von jeweils 3 Stdn. wurde mit dreimal je 20 ml Dichlormethan und Äthanol nachgewaschen. Alle Reaktionsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

   Asparagin und Glutamin wurden als aktivierte Ester, Boc-Asn-ONP und Boc-Gln-ONP, zur Synthese eingesetzt. Die sich dabei ergebenden geringen Abweichungen des beschriebenen Syntheseplanes sind auf S. 25 beschrieben.

Abspaltung der /Ala^{12}/-A-Kette des Schafinsulins vom Träger (XLI

Zur Abspaltung der A-Kette vom Träger wurde das Harz in 30 ml Trifluoressigsäure suspendiert. Durch diese Suspension wurde 90 Min. lang Bromwasserstoff geperlt, danach das Harz abfiltriert und dieses noch dreimal mit je 10 ml Trifluoressigsäure und 10 ml Trifluoressigsäure/Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingeengt und der ölige Rückstand mit Äther verrieben. Das dabei pulverig fest gewordene Produkt wurde abzentrifugiert, dreimal mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 550 mg = ca. 40% d. Th.
(während der Abspaltung vom Harz werden teilweise auch die Diphenylmethylgruppen entfernt)

Schwefelanalyse: ber.: S ca. 4,5
gef.: S 4,6

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 24 Stdn.)

	Asp	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Ile	Leu	Tyr
theor.:	2,00	4,00	2,00	2,00	4,00	2,00	1,00	2,00	2,00
gef.:	2,96	4,36	2,00*	2,00*	2,82	1,50	0,55	2,36	0,62

* bezogen auf den Mittelwert von Ala und Gly.
Cys(Dpm) wurde nicht bestimmt.

Tetra-S-sulfonat der variierten Schafinsulin-A-Kette (XLII)

1. Abspaltung der Diphenylmethylgruppen
120 mg der noch teilgeschützten A-Kette wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und dazu 40 mg (2-3facher Überschuß) Phenol gegeben. Anschließend wurde 25 Min. am Rückfluß unter Feuchtigkeitsausschluß gekocht, die Trifluoressigsäure danach abdestilliert und der Rückstand mit Äther verrieben. Das pulverige feste Produkt wurde dreimal mit Äther gewaschen und getrocknet.

2. Sulfitolyse
Das durch Behandlung mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Phenol erhaltene A-Ketten-Produkt wurde in wenig dest. Wasser suspendiert und durch Einstellen mit verdünnter Natronlauge auf pH 9,2 in Lösung gebracht. Anschließend wurden 10 ml Tris-Puffer pH 9,2, 250 mg Natriumsulfit und 200 mg Natriumtetrathionat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stdn. bei 37° wurde das erhaltene Buntesalz durch Gefriertrocknung isoliert. Die Entsalzung und Reinigung erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G-25, eingeschlämmt in 0,02 M Ammoniumhydrogencarbonat. Nach der Elution mit 0,02 M Ammoniumhydrogencarbonat wurden die Fraktionen des

Haupt-Peaks gesammelt und das A-Ketten-Produkt durch Gefriertrocknung isoliert.

Ausbeute: 70 mg = 65% d. Th.
(bezogen auf die eingesetzte Menge an diphenylmethylgeschützter Kette)

Schwefelanalyse: ber.: S 9,7
gef.: S 9,0

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 24 Stdn.)

	Asp	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Ile	Leu	Tyr
theor.:	2,00	4,00	2,00	2,00	4,00	2,00	1,00	2,00	2,00
gef.:	2,21	3,75	1,89*	2,16*	3,08	1,77	0,64	2,21	0,87

* bezogen wurde auf den Mittelwert von Gly und Ala.

Bei der Niedervolt-Papierelektrophorese in Ameisensäure/Essigsäure/Harnstoffpuffer pH 1,9 wurden sieben Banden sichtbar.

Kombination der /Ala^{12}/-Tetra-S-sulfonat-A-Kette des Schafinsulins mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette zum entsprechenden Hybridinsulin (XLIII)

Die Kombination dieses A-Ketten-Produktes mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette wurde wie bei XVII, beschrieben auf S. 62, durchgeführt.

Die Messung der Insulinaktivität erfolgte im Mäusefalltest und im Fettkörpertest am Nebenhodenfettgewebe der Ratte. Die Aktivität des erhaltenen Insulins wurde im Mäusefalltest zu 0,35% und im Fettkörpertest zu 0,37% bestimmt.

3.10 Synthese der /Āla^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}, Ala^{21}/7-A-Kette des Schafinsulins

tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-isoleucyl-valyl-glutamyl-γ-benzylester-glutaminyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-alanyl-glycyl-valyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-alanyl-leucyl-phenylalanyl-glutaminyl-leucyl-glutamyl-γ-benzylester-asparaginyl-phenylalanyl-S-diphenylmethyl-cysteinyl-alanyl-POLYMER (XLIV)

Die Synthese dieser /Āla^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}, Ala^{21}/7-A-Kette des Schafinsulins wurde, ausgehend von 2 g Boc-Ala-Polymer mit einer Beladung von 0,25 mMol Boc-Ala/g Harz, in gleicher Weise durchgeführt wie die Synthese der /Āla^{12}/7-A-Kette. An Stelle von Boc-Tyr(OBzl) wurde Boc-Phe verwendet und an Stelle von Asn stand Ala.

Abspaltung der /Āla^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}, Ala^{21}/7-A-Kette vom Träger

Die Abspaltung erfolgte wie für XLI auf S. 82 beschrieben.

Ausbeute: 700 mg = ca. 55% d. Th.

Elementaranalyse: Da dieses A-Ketten-Produkt durch die Trifluoressigsäure/HBr-Behandlung schon teilweise schwefelungeschützt vorliegt, lassen sich über Molekulargewicht und Summenformel nur ungefähre Angaben machen.

ber.: S ca. 4,50
gef.: S 4,62

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 24 Stdn.)

	Asp	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe
theor.:	1,00	4,00	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	2,00
gef.:	1,00*	3,17	1,58	2,80	1,44	0,65	2,01*	1,98*

* bezogen wurde auf den Mittelwert von Asp, Leu und Phe.
Cys sowie Cys(Dpm) wurden nicht bestimmt.

Tetra-S-sulfonat der variierten Schafinsulin-A-Kette (XLV)

Die Abspaltung der Diphenylmethylgruppen und die sich anschließende Sulfitolyse erfolgten wie bei XVII, S. 83.

Zwecks Entsalzung und Reinigung wurde das lyophilisierte Buntesalz in 3 ml 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Säule mit Sephadex G-25 aufgetragen. Die Elution erfolgte mit demselben Puffer. Die Fraktionen 5 bis 16 wurden aufgefangen und gefriergetrocknet (Abb. 9).

Die Gesamtausbeute an salzfreiem Lyophilisat betrug 59 mg = 80%. Davon entfielen auf die Hauptfraktionen 47 mg = 65% d. Th., bezogen auf eingesetztes ungeschütztes A-Ketten-Produkt.

Elementaranalyse: $C_{195}H_{149}N_{24}O_{41}S_8$ (2626,9)

ber.: S 9,7
gef.: S 8,5

Aminosäureanalyse:
Hydrolyse in 6 n HCl (110°, 24 Stdn.)

	Asp	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe
theor.:	1,00	4,00	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	2,00
gef.:	1,00*	3,46	1,72	2,87	1,52	0,67	2,02*	2,00*

* bezogen wurde auf den Mittelwert von Asp, Leu und Phe. Cys wurde nicht bestimmt.

Dünnschichtchromatographisch war das A-Ketten-Produkt einheitlich.

Nach Kombination des variierten Tetra-S-sulfonates mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette zum entsprechenden Hybridinsulin wurde im Mäusefalltest eine Insulinaktivität von ungefähr 0,1% erhalten.

4. Zusammenfassung

Die variierte /Ala^{12}, Phe^{14}, Phe^{19}/-A-Kette des Schafinsulins wurde nach konventioneller Methodik durch Fragmentkondensation von Teilpeptiden über ihre S-benzylierte Form synthetisiert.

Der letzte Syntheseschritt war die Kupplung eines Nonapeptidderivates mit einem Dodecapeptidderivat nach der gemischten Anhydrid-Methode. Diese beiden Peptidderivate wurden aus kleineren Fragmenten durch Azidkupplung aufgebaut. Die Teilpeptide ihrerseits wurden in den meisten Fällen stufenweise über ihre Benzyloxycarbonylaminosäure-p-nitrophenylester synthetisiert.

Das geschützte Heneikosipeptid wurde mit Trifluoressigsäure und mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak deblockiert und durch Sulfitolyse in die Tetra-S-sulfonatform übergeführt.

Nach Kombination des S-sulfonates mit natürlichem Bis-S-sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette wurde eine biologische Aktivität von 1,2% im Mäusefalltest und 1% im Fettkörpertest erhalten.

Die Aktivitäten dieses Hybridinsulins lagen damit in demselben Größenordnungsbereich wie die des Hybridinsulins aus synthetischer A-Kette mit der Sequenz des Schafinsulins und natürlicher B-Kette des Rinderinsulins.

Dies läßt den Schluß zu, daß die phenolischen Hydroxygruppen der A-Kette für die biologische Wirksamkeit des Insulins nicht notwendig sind.

Das Pentapeptid mit Beziehung zum C-terminalen Ende der A-Kette Glu-Asn-Phe-Cys-Ala wurde mit Hilfe der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD unter Verwendung des S-Diphenylmethyl-Restes als Thiolgruppenschutz synthetisiert. Die Deblockierung der SH-Gruppe wurde mit siedender Trifluoressigsäure in Gegenwart von Phenol durchgeführt. Die Behandlung verlief für das Peptid ohne Schaden.

Damit wurde erstmals ein cysteinhaltiges Peptid unter Verwendung der Festkörpersynthese über eine andere als die S-benzylierte Form dargestellt. Die Vorteile, die damit verbunden sind, werden diskutiert.

Der Einfluß von siedender Trifluoressigsäure auf Rinderinsulin-A-Kette und Rinderinsulin wurde geprüft. Da dabei keine nennenswerten Schädigungen der Polypeptidketten festgestellt werden konnten, wurden zwei variierte A-Ketten des Schafinsulins mit Hilfe der Peptidsynthese am Festkörper unter Verwendung des S-Diphenylmethyl-Restes aufgebaut.

Nach der Synthese der $\lfloor\bar{A}la^{12}\rfloor$-A-Kette des Schafinsulins wurde diese in 40%iger Ausbeute als Rohprodukt erhalten. Die Ausbeute an Rohprodukt der stärker variierten $\lfloor\bar{A}la^{12}$, Phe^{14}, Phe^{19}, $Ala^{21}\rfloor$-A-Kette des Schafinsulins konnte auf 55%, bezogen auf die erste Aminosäure, gesteigert werden.

Nach Deblockierung der Schutzgruppen und Überführung in die entsprechenden Buntesalze wurden nach Kombination mit natürlicher B-Kette des Rinderinsulins biologische Aktivitäten von ungefähr 0,4% bzw. 0,1% erhalten.

Die S-diphenylmethylierten A-Ketten des Schafinsulins waren die ersten, nach der Festkörpersynthese aufgebauten, größeren Cysteinpeptide, die ohne Anwendung von Natrium in flüssigem Ammoniak deblockiert werden konnten. Die daran geknüpften Hoffnungen auf eine Aktivitätssteigerung nach Kombination mit natürlicher B-Kette erfüllten sich jedoch nicht. Die erhaltenen Aktivitäten lagen unter den Werten von Hybridinsulinen, deren A-Ketten über die S-benzylierte Form synthetisiert wurden.

Literaturverzeichnis

1) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn
Z. Naturforsch. 18 b, 1120 (1963)

2) P.G. Katsoyannis, K. Fukuda und A. Tometsko
J. Amer. Chem. Soc. 85, 2863 (1963)

3) P.G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki und M. Tilak
J. Amer. Chem. Soc. 86, 930 (1964)

4) Y. Wang, J.-Z. Hsu, W.-c. Chang, L.-l. Cheng, H.-s. Li, C.-y. Hsing, P.-t. Shi, T.-p. Loh, A.-h. Chi, C.-h. Li, Y.-h. Yieh und K.-l. Tang
Scientia Sinica 14, 1887 (1965)

5) P.G. Katsoyannis, A.M. Tometsko, J.Z. Ginos und M.A. Tilak
J. Amer. Chem. Soc. 88, 164 (1966)

6) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 88, 166 (1966)

7) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 89, 4505 (1967)

8) P.G. Katsoyannis, A.C. Trakatellis, C. Zalut, S. Johnson, A. Tometsko, G. Schwarz und J. Ginos
Biochemistry 6, 2656 (1967)

9) U. Weber, F. Schneider, P. Köhler und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 947 (1967)

10) U. Weber, S. Hörnle, G. Grieser, K.-H. Herzog und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1715 (1967)

11) U. Weber
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1749 (1968)

12) H.C. Reitz, H. Fraenkel-Conrat et. al.
J. Amer. Chem. Soc. 68, 1024 (1946)

13) D. Nicol
Biochim. Biophys. Acta 34, 257 (1959)

14) C.H. Li
Nature/London/ 178, 1402 (1956)

15) L. Weil, T. Seibles und T. Herskovits
Arch. Biochem. Biophys. 111, 308 (1965)
16) K. Stern und A. White
J. Biol. Chem. 122, 371 (1938)
17) L. Sluyterman und J. Kwestruo-van-den-Bosch
Biochim. Biophys. Acta 38, 102 (1960)
18) M. Glendening, D. Grundberg und H. Fraenkel-Conrat
J. Biol. Chem. 167, 125 (1947)
19) I. Sizer und C. Brindley
J. Biol. Chem. 185, 323 (1950)
20) D. Kertesz
Nature 165, 523 (1950)
21) U. Cory, C. Bigelow und E. Frieden
Biochemistry 1, 419 (1962)
22) J. Fraenkel-Conrat und H. Fraenkel-Conrat
Biochim. Biophys. Acta 5, 89 (1950)
23) C.R. Harington und A. Neuberger
Biochem. J. 30, 809 (1936)
24) R.H. Siefferd und V. du Vigneaud
J. Biol. Chem. 108, 753 (1935)
25) V. du Vigneaud, L.F. Audrieth und H.S. Loring
J. Amer. Chem. Soc. 52, 4500 (1930)
26) V. du Vigneaud und G.L. Miller
J. Biol. Chem. 116, 469 (1936)
27) V. du Vigneaud
Les Prix Nobel en 1955. Kungl. Boktr. P.A. Norstedt and Söner, Stockholm 1956
28) Chinesische Arbeitsgruppe
Scientia Sinica 15, 232 (1966)
29) Private Mitteilung von Y. Shimonishi
Deutsches Wollforschungsinstitut Aachen
30) R.B. Merrifield
J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)
31) R.B. Merrifield
J. Amer. Chem. Soc. 86, 304 (1964)
32) R.B. Merrifield
Biochemistry 3, 1385 (1964)

33) R.B. Merrifield
J. Org. Chem. 29, 3100 (1964)
34) R.B. Merrifield
Endeavour 24, 3 (1965)
35) R.B. Merrifield
Science 150, 178 (1965)
36) R.B. Merrifield und J.M. Stewart
Nature/London 207, 522 (1965)
37) A. Marglin und R.B. Merrifield
J. Chem. Soc. 88, 5051 (1966)
38) S. Hörnle
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1355 (1967)
39) H. Zahn, T. Okuda und Y. Shimonishi
Angew. Chem. 79, 424 (1967)
40) J. Leonard und R.B. Robinson
J. Amer. Chem. Soc. 89, 181 (1967)
41) V.A. Najjar und R.B. Merrifield
Biochemistry 5, 3765 (1966)
42) J.M. Stewart und D.W. Wooley
Nature 206, 619 (1965)
43) G.R. Marshall und R.B. Merrifield
Biochemistry 4, 2394 (1965)
44) M.C. Khosla, R.R. Smeby und F.M. Bumpus
Biochemistry 6, 754 (1967)
45) J. Halstrom und H. Klostermeyer
Liebigs Ann. Chem.
46) H. Klostermeyer und J. Föhles
Chem. Ber. 101, 2823 (1968)
47) G. Amiard, R. Heymes und L. Velluz
Bull. Soc. Chim. France 1955, 191
48) L. Zervas und D.M. Theodoropoulos
J. Amer. Chem. Soc. 78, 1359 (1956)
49) A. Berger, J. Noguchi und E. Katchalski
J. Amer. Chem. Soc. 78, 4483 (1956)
50) G.F. Holland und L.A. Cohen
J. Amer. Chem. Soc. 80, 3765 (1958)
51) W. König, R. Geiger und W. Siedel
Chem. Ber. 101, 681 (1968)

52) G.L. Ellman
Arch. Biochem. Biophysics 82, 70 (1959)
53) L. Zervas, I. Photaki und N. Ghelis
J. Amer. Chem. Soc. 85, 1337 (1963)
54) L. Zervas und I. Photaki
J. Amer. Chem. Soc. 84, 3887 (1962)
55) R.W. Hanson und H.D. Law
J. Chem. Soc. 1965, 7285
56) S. Hörnle, U. Weber und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1428 (1968)
57) H. Zahn, H. Bremer und R. Zabel
Z. Naturforsch. 20b, 653 (1965)
58) P.G. Katsoyannis, K. Suzuki und A. Tometsko
J. Amer. Chem. Soc. 85, 1139 (1963)
59) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 88, 5618 (1966)
60) P.G. Katsoyannis, A.M. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 88, 5625 (1966)
61) M. Bergmann und L. Zervas
Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932)
62) D. Ben-Ishai und A. Berger
J. Org. Chem. 17, 1564 (1952)
63) E. Tascher, B. Liberek, C. Wasielewski und J.E. Biernat
Angew. Chem. 71, 743 (1959)
64) M. Bergmann, L. Zervas und L. Salzmann
Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1288 (1933)
65) S.J. Leach und H. Lindley
Austral. J. Chem. 7, 173 (1954)
66) E. Sondheimer und R.W. Holley
J. Amer. Chem. Soc. 76, 2467 (1954)
67) E. Sondheimer und R.W. Holley
J. Amer. Chem. Soc. 79, 3767 (1957)
68) J. Rudinger
Angew. Chem. 71, 742 (1959)
69) J. Föhles
Unveröffentlichte Versuche, DWFI Aachen
70) H. Zahn, H. Bremer, W. Sroka und J. Meienhofer
Z. Naturforsch. 20b, 646 (1965)

71) M. Bodanszky
Nature/London 175, 685 (1955)
72) M. Bodanszky und J.C. Sheehan
Chem. and Ind. 1966, 1597
73) P. Köhler
Diplomarbeit Institut f. Physiolog. Chemie Tübingen 1966
74) R. Zabel und H. Zahn
Z. Naturforsch. 20b, 650 (1965)
75) H. Zahn, H. Bremer und R. Zabel
Z. Naturforsch. 20b, 653 (1965)
76) P.G. Katsoyannis und A.M. Tometsko
Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 1554 (1966)
77) K.W. Pepper, H.M. Paisley und M.A. Young
J. Chem. Soc. (London) 1953, 4097
78) J.C. Sheehan und G.P. Hess
J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)
79) J.C. Sheehan, M. Goodman und G.P. Hess
J. Amer. Chem. Soc. 78, 1367 (1956)
80) N.A. Smart, G.T. Young und M.W. Williams
J. Chem. Soc. 1960, 3902
81) M. Bodanszky und V. du Vigneaud
J. Amer. Chem. Soc. 81, 5688 (1959)
82) D.T. Gish, P.G. Katsoyannis, G.P. Hess und R.J. Siedman
J. Amer. Chem. Soc. 78, 5954 (1956)
83) R. Schwyzer und P. Sieber
Nature 199, 172 (1963)
84) W.E. Handby, S.G. Waley und J. Watson
J. Chem. Soc. 1950, 3245
85) D. Cavallini, M.T. Graziani und S. Dupré
Nature (London) 212, 294 (1966)
86) E. Schnabel
Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)
87) C.G. Greig und D.H. Leaback
Nature 188, 310 (1960)
88) E. Merck AG, Darmstadt
Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie

89) F. Weygand und W. Steglich
Z. Naturforsch. 14b, 472 (1959)
90) D.M. Young und A.H. Lewis
Science (New York) 105, 368 (1947)
91) M. Bodanszky und V. du Vigneaud
J. Amer. Chem. Soc. 81, 2505 (1959)
92) B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber und R. Schwyzer
Helv. Chim. Acta 40, 373 (1957)
93) M. Brenner und W. Huber
Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953)
94) M. Bodanszky und V. du Vigneaud
J. Amer. Chem. Soc. 81, 6072 (1959)
95) S.W. Fox und M. Fling
J. Amer. Chem. Soc. 72, 1862 (1950)
96) L.A. Carpino et al.
J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959)
97) G.W. Anderson und A.C. McGregor
J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180 (1957)
98) E. Schröder und E. Klieger
Liebigs Ann. Chem. 673, 208 (1964)
99) E. Sandrin und R.A. Boissonnas
Helv. chim. Acta 46, 1637 (1963)
100) Biochemical Preparations Vol. 12, S. 92 (1968)
101) E. Wünsch und A. Zwick
Chem. Ber. 97, 3312 (1964)
102) H. Zahn. W. Danho und B. Gutte
Z. Naturforsch. 20b, 768 (1966)
103) F.C. McKay und N.F. Albertson
J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 (1957)
104) R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappeler
Helv. chim. Acta 42, 2622 (1959)
105) E. Wünsch, G.Fries und A.Zwick
Chem. Ber. 91, 542 (1958)

L e b e n s l a u f

Am 1. Juli 1938 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Walter Köhler in Hirschberg, Schlesien, geboren.

Nach der Übersiedlung nach Westdeutschland im Jahre 1946 besuchte ich zunächst die Volksschule in Negenborn und darauf in Celle die Hermann-Billung-Schule, ein naturwissenschaftlich-neusprachliches Gymnasium. Nach bestandenem Abitur begann ich 1959 in Hamburg mit dem Studium der Naturwissenschaften, das ich in Würzburg und Tübingen fortsetzte.

Schwerpunkt meiner Studien war zu der Zeit die Zoologie, insbesondere das Gebiet der Zoophysiologie am Institut für Zoophysiologie der Universität Tübingen. Nach der Einführung des Biochemie-Studiums an der Universität Tübingen im Jahre 1962 änderte ich meine Studienrichtung dahingehend, daß ich auf das Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie überwechselte. Im Herbst 1963 bestand ich den ersten Teil, im Winter 1964 den zweiten Teil der Diplom-Vorprüfung für Biochemiker.

Im März 1966 begann ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel mit der Diplomarbeit mit dem Thema:"Synthese eines Pentapeptids der Sequenz Glu-Asn-Phe-Cys-Asn" und bestand nach Abschluß dieser Arbeit im Januar 1967 die Diplom-Hauptprüfung für Biochemiker.

Anschließend bearbeitete ich, ebenfalls im Physiologisch-chemischen Institut, die vorliegende Dissertation: "Vergleichende Untersuchungen zur Synthese variierter Insulin-A-Ketten".

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:

Physiologische Chemie:	F. Schneider, G. Weitzel
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff
Organische Chemie:	E. Bayer, E. Müller
Physikalische Chemie:	G. Kortüm, H. Mauser
Physik:	H. Krüger
Mathematik:	W. Schweizer
Anatomie:	K. Mörike
Botanik:	E. Bünning
Zoologie:	K.G. Grell, F.P. Möhres, H. Peters
Mikrobiologie:	F. Lingens
Pharmakologie:	F. Lembeck

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen